

N° 90

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LYON

EN VUE DE L'OBTENTION

DU GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Pierre DODEL

Docteur en Médecine,

Licencié ès-Sciences,

Chargé du Cours Complémentaire de Physiologie
à l'Ecole de Médecine de Clermont-Ferrand

1^{re} THESE. — DONNÉES EXPÉRIMENTALES RELATIVES AUX
PHÉNOMÈNES DE PHYLAXIE.

2^e THESE. — 1^o L'IMMUNITÉ CHEZ LES VÉGÉTAUX, PATHO-
LOGIE VÉGÉTALE ET PATHOLOGIE ANIMALE.
2^o LES FORMATIONS SÉDIMENTAIRES DE LA
LIMAGNE.

Soutenues le 25 juin 1929 devant la commission d'examen :

MM. le Professeur CARDOT,
le Professeur BEAUVERIE,
le Professeur ROMAN,

CLERMONT-FERRAND

IMPRIMERIE GÉNÉRALE, DE BUSSAC, 2, COURS SABLON

1929

DONNÉES
EXPÉRIMENTALES
relatives
AUX PHÉNOMÈNES
de
PHYLAXIE



UNIVERSITÉ DE LYON — FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. DEPÉRET, O.   I., , Membre de l'Institut.

Assesseur

M. KÆHLER, O.   I., , Correspondant de l'Institut.

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, O.   I.

GERARD, O.   I., , C. ; RIGOLLOT,   I. ;

VAUTIER,  I. ; LE VASSEUR,   I.

OFFRET,   I., .

Professeurs titulaires

MM. DEPÉRET, O.   I., , Membre de l'Institut, *Géologie*.

KÆHLER, O.   I., , Correspondant de l'Institut, *Zoologie*

DULAC,   I., *Calcul différentiel et intégral*.

MASCART,   I., *Astronomie physique*.

GRIGNARD, O.   I., , P. N., Membre de l'Institut, *Chimie générale*.

SIRE,  I., , *Mécanique rationnelle et appliquée*.

MEUNIER,   I., , *Chimie industrielle*.

COUTURIER,  I., , *Chimie agricole*.

BEAUVÉRIE,   I., , *Botanique*.

THOVERT,   I., , *Physique*.

CARDOT,  , *Physiologie générale et comparée*.

VANEY,   I., , *Zoologie*.

LONGCHAMON,  , *Minéralogie théorique et appliquée*.

Professeurs titulaires (sans chaire)

MM. LOCQUIN,   I., *Chimie générale*.

JOB,  I., *Chimie physique*.

DOUIN,  I., *Botanique*.

DÉJARDIN,  I., *Physique*.

ROMAN,  I., *Géologie*.

LEMARCHANDS,  I., *Chimie industrielle*.

Maîtres de conférences et Chargés de cours complémentaires

MM. EYRAUD,  , *Mathématiques*.

RICHE,  I., *Géologie*.

BONNET,  I., *Zoologie appliquée et Zootechnie*.

MAYET,   I., *Anthropologie*.

PELOSSE,  I., *Sériciculture*.

DONCIEUX,  I., P. C. N., *supérieur*.

SEYEWETZ,   I., *Matières colorantes artificielles*.

M^{lle} BACHRACH, , *Physiologie*.

Secrétaire

M^{me} NÉTIEU, .

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LYON

EN VUE DE L'OBTENTION

DU GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Pierre DODEL

Docteur en Médecine,

Licencié Ès-Sciences,

Chargé du Cours Complémentaire de Physiologie

A l'Ecole de Médecine de Clermont-Ferrand

1^{re} THÈSE. — DONNÉES EXPÉRIMENTALES RELATIVES AUX
PHÉNOMÈNES DE PHYLAXIE.

2^e THÈSE. — 1^o L'IMMUNITÉ CHEZ LES VÉGÉTAUX, PATHO-
LOGIE VÉGÉTALE ET PATHOLOGIE ANIMALE.

2^o LES FORMATIONS SÉDIMENTAIRES DE LA
LIMAGNE.

Soutenues le 25 juin 1929 devant la commission d'examen :

MM. le Professeur CARDOT,
le Professeur BEAUVERIE,
le Professeur ROMAN,

CLERMONT-FERRAND

IMPRIMERIE GÉNÉRALE, DE BUSSAC, 2, COURS SABLON

1929



A la mémoire

de mon Maître G. BILLARD



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Avant - Propos

Les recherches expérimentales que nous présentons dans ce travail ont été, pour la plupart, entreprises sur les conseils de notre maître M. G. Billard, quelques-unes en collaboration avec lui. Elles font, en effet, partie d'une série de travaux relatifs à la Phylaxie et conçus en vue d'établir sur des bases précises la théorie de ce phénomène.

Notre but est d'appuyer, par des faits d'expérience, l'interprétation proposée des phénomènes de protection de l'organisme par une neurotoxine contre une autre neurotoxine. Ces phénomènes, que M. Billard a entièrement découverts et auxquels il a donné le nom de Phylaxie, il ne les a pas simplement envisagés dans leurs modalités extérieures. Par une conception géniale, il s'est élevé du particulier des faits qu'il avait patiemment rassemblés à leur généralisation et à leur coordination. S'il a eu l'intuition véritable du mécanisme intime de ces actions, son clair génie a soumis son hypothèse au contrôle des faits déjà connus, complétés par un vaste plan de vérification expérimentale. Notre part dans cette œuvre, fut de collaborer à ce contrôle expérimental. Nous avons toujours soumis nos conclusions d'expériences à M. Billard et c'est en parfait accord avec lui que nous pouvons les exprimer ici ; après sa disparition nous avons poursuivi nos recherches dans la même voie et nous espérons être resté dans l'esprit général de l'œuvre magnifique du Maître regretté.



Introduction

LA PHYLAXIE. — Durant les années 1926-1927 et 1928, M. G. Billard a fait paraître, en divers notes et mémoires, les résultats d'expériences très curieuses, relatives à la neutralisation de poisons par d'autres substances toxiques ou non. Cette neutralisation était obtenue soit par le mélange *in vitro* des deux substances, soit par l'injection préalable à l'animal de la substance à effet protecteur. La caractéristique de ces oppositions réside en ce que les substances toxiques et protectrices se fixent sur le même élément vital : le système nerveux cérébro-spinal. Les antagonismes ont été signalés, en effet, entre les substances dites neurotoxiques.

A ces phénomènes très particuliers, relevant d'un même mécanisme, Billard a donné le nom de « Phylaxie » (de φυλασσειν), mot très expressif car il ne s'agit pas d'immunisation au sens biologique du mot, moins encore de neutralisation, mais bien d'une véritable *protection* de l'organisme.

La première observation de phylaxie que fit Billard, remonte à 1910. Au cours de recherches sur l'inactivation de la toxine tétanique par le suc d'autolyse de foie de porc, il vit qu'un cobaye ayant résisté à l'injection du mélange suc de foie-toxine tétanique, peut recevoir 4 jours après plusieurs doses mortelles de venin sans présenter d'accidents (1). Cette expérience, répétée un grand nombre de fois dans les mêmes conditions, puis avec l'injection préalable de toxine tétanique seule, à dose hypomortelle, fut toujours suivie du même résultat. Il n'était donc pas téméraire de conclure que la toxine tétanique protège contre le venin. L'inverse n'a pu être obtenu : l'envenimation préalable n'empêche pas les effets de la toxine tétanique.

(1) In. E. DECHAMBRE. Du suc d'autolyse de foie de porc. Thèse doct. en Médecine Toulouse 1910.

Par un nombre considérable d'expériences, G. Billard a étendu cette notion à un grand nombre d'autres faits relevant de la phylaxie. Nous allons les énumérer sommairement, puis nous exposerons la théorie de G. Billard sur le mécanisme probable de ces phénomènes. Nous terminerons cette introduction par une revue des faits connus à l'heure actuelle pouvant entrer dans le cadre de la phylaxie.

1° *La spartéine protège contre le venin de vipère* (1). — Le cobaye est tué par une dose de 7 milligrammes de sulfate de spartéine pour cent grammes d'animal ; en injectant une dose hypomortelle, 5 milligrammes, le cobaye survit après avoir présenté quelques accidents parétiques. Si l'on injecte alors (pendant cet état de mal spartéinique) une dose de venin sûrement mortelle, l'animal survit, contrairement à toute attente, les deux poisons paraissant devoir additionner leur action. Ces poisons ont, en effet, l'un et l'autre, une action élective sur le système nerveux. Le mélange *in vitro* de la spartéine et du venin (la spartéine étant à dose hypomortelle) n'est pas toxique ; mais l'injection de spartéine, faite peu de temps après celle de venin, n'a jamais empêché les accidents. Soit préventivement, soit par le mélange *in vitro*, la spartéine a donc une action phylactique contre le venin de vipère et cela dans de larges limites car on a pu ainsi injecter 5 et même 10 fois, la dose mortelle sans inconvénients.

2° *La spartéine protège contre la toxine diphtérique* (2). — L'injection préventive, de même que le mélange *in vitro*, empêche l'action toxique de la toxine diphtérique.

3° *La spartéine protège contre la toxine tétanique* (3). — Les choses sont, ici, un peu plus compliquées, la toxine tétanique étant une toxine à incubation (M. Nicolle), il faut que l'injection de sulfate de spartéine soit faite plusieurs jours avant celle de toxine. Voici les chiffres donnés par M. Billard :

Cobaye témoin, toxine tétanique, mort en 92 heures.

Cobaye A, toxine tétanique injectée 24 heures après la spartéine (5 mill. pour 100 gr. d'animal), mort en 24 heures.

(1, 2 et 3) G. BILLARD. Immunisation non spécifique du cobaye par certaines neurotoxines contre d'autres neurotoxines ; hiérarchie des nemo-toxines. *Journ. Physiol. et Path. gén.* 1927, XXIV, 53.

Cobaye B, toxine tétanique, 3 jours après la spartéine, mort en 130 heures.

Cobaye C, toxine tétanique, 9 jours après la spartéine : survie sans accidents.

Cobaye D, toxine tétanique, 13 jours après la spartéine : survie sans accidents.

G. Billard a montré que la spartéine s'accumule dans l'organisme, son élimination est donc assez lente et il n'est pas surprenant que son action persiste pendant plusieurs jours.

Ces faits expérimentaux, relatifs à la phylaxie par la spartéine, ont été confirmés par MM. Dujarric de la Rivière, M. Tissier et A. Lafaille. (1)

4° *La toxine tétanique protège contre la toxine diphtérique* (2). — Billard a montré, en outre, qu'un cobaye traité par une dose non mortelle de toxine tétanique résistait, quelques jours plus tard, à une dose mortelle de toxine diphtérique :

« Cobaye pesant 390 grs. reçoit le 28 janvier 1925, 5 millièmes de milligrammes de toxine tétanique vieillie (1914) et par la suite ne présente pas d'accidents appréciables, sauf léger tétanos local.

« Le 20 février, poids 500 grs. (femelle pleine), on lui injecte une dose de toxine diphtérique qui tue le témoin en 24 heures. Survie sans accidents. »

M. Ramon a signalé que ses expériences d'immunisation de l'animal contre la t. diphtérique par la t. tétanique ne confirmaient pas celles de M. Billard. Mais, comme ce dernier l'a démontré, le désaccord n'est qu'apparent et apporte même un sérieux appui à la théorie de la phylaxie. M. Ramon, en effet, a immunisé ses animaux par l'anatoxine tétanique, c'est-à-dire par un mélange de formol et de toxine et non pas avec de la toxine pure comme l'a fait M. Billard. Nous allons voir que le formol n'est pas une substance inactive du point de vue de la phylaxie.

5° *Le formol protège contre les neurotoxines.* — Ce pouvoir phylactique est très net vis-à-vis de la spartéine :

(1) C. R. Soc. Biol. 23 juillet 1927.

(2) G. BILLARD. Immunisation non spécifique du cobaye, etc. *Journ Physiol. et Path. gén.*, 1927, XXIV.

« Le 16 déc. j'injecte 4 cobayes :

A / Avec de l'uroformine Gobey (3 centig. pour 100 grs de poids) et spartéine Poullenc (10 milligrammes pour 100 grs), mélange *in vitro*, mort en 45 minutes.

B / Avec de l'uroformine, 15 minutes avant la spartéine : survie sans accidents.

C / Avec de l'uroformine, 15 minutes après la spartéine : mort en 20 minutes.

D / Témoin : mort en 45 minutes ».

Les mêmes expériences ont été refaites, non plus avec de l'uroformine dont la transformation en formol est certaine dans l'organisme et demande peut-être un certain temps, mais avec l'anatoxine tétanique et la spartéine. Dans ces expériences l'anatoxine ne fait qu'apporter le formol. Dans ce cas c'est par le mélange *in vitro* de spartéine et d'anatoxine que le cobaye est protégé.

Le formol phylactise également l'animal contre la toxine diphtérique :

« Cobaye n° 1, poids 440 grs. Injection à 9 h. 45 d'une dose mortelle de toxine diphtérique : survie 25 h. 30.

Cobaye n° 2, poids 330 grs. Injection à 9 h. 47 d'une même dose de toxine diphtérique proportionnelle au poids et mélangée *in vitro* à 1 cc. d'anatoxine tétanique : survie sans accidents.

Cobaye n° 3, poids 330 grs. Injection de toxine diphtérique à 9 h. 49 et 15 minutes après d'anatoxine tétanique : mort en 25 h. 45.

Cobaye n° 4, poids 230 grs. Injection de 1 cc. d'anatoxine tétanique à 10 h. et 15 minutes après toxine diphtérique (dose mortelle) : mort en 25 h. 25.

Cobaye n° 5, poids 200 grs. Injection à 10 h. 05 de 1 cc. d'anatoxine tétanique dans le péritoine et aussi après de la toxine diphtérique sous la peau : survie 30 h. 45 ».

L'action du venin de vipère est également empêchée par le formol.

« 1° Cobaye témoin à 2 dixièmes de milligrammes pour 100 grs : mort en 12 heures.

2° Cobaye injecté par mêmes doses de venin 15 minutes après l'injection d'uroformine à 3 centigrammes pour 100 grs : survie 24 heures.

3° Cobaye injecté à l'uroformine mélangée avec le venin : survie 6 h. 30.

4° Cobaye injecté à l'uroformine 15 minutes après le venin : présente accidents locaux par hémorragie et survit. » (1)

L'action phylactique du formol est donc indéniable et l'on comprend que dans les expériences de Ramon les cobayes injectés à l'anatoxine n'étaient pas du tout dans les mêmes conditions que ceux injectés à la toxine tétanique. Les phénomènes de phylaxie donnent la clé du mode d'action des anatoxines ainsi que nous le verrons en étudiant le mode d'action des substances phylactisantes.

6° *Certaines eaux minérales protègent contre certaines neurotoxines.* — Ce n'est pas seulement par le mélange *in vivo* — auquel cas on pourrait penser à des précipitations des substances toxiques — mais c'est aussi par des injections préventives d'eaux minérales que les cobayes sont protégés contre certains poisons. Les eaux du Mont-Dore (Madeleine) et de La Bourboule (Choussy), inactivent la spartéine (2). Celles du Mont-Dore (Chanteurs) inactivent la phalline ; celles de Châtel-Guyon (Gubler, Germaine, Deval) inactivent le venin (3) ; celles de Saint-Nectaire (Rocher, Saint-Cezaire) inactivent la toxine diphtérique (4), et La Bourboule (Choussy) paraît adaptée à la toxine tétanique (5).

Ces faits, extrêmement curieux, ont montré à M. Billard une spécificité d'eau à l'égard de telle ou telle neurotoxine, car l'eau qui inactive le venin est sans effet sur la toxine tétanique. Pour cette toxine, la phylaxie par les eaux minérales, ainsi que nous

(1) G. BILLARD. La Phylaxie. *Journ. Physiol. et Path. gén.*, 1928, XXV, (n° 1), 45.

(2) G. BILLARD. Pouvoir anagotoxique des eaux de La Bourboule et du Mont-Dore sur le sulfate de spartéine. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, XCIV, 182.

(3) G. BILLARD. Pouvoir anagotoxique des eaux de Châtel-Guyon sur le venin de vipère. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, XCIV, 1140.

(4) G. BILLARD. Pouvoir anagotoxique *in vivo* et *in vitro* de l'eau de Saint-Nectaire sur la toxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, XCV, 74.

(5) G. BILLARD et COURTIAL. Pouvoir anagotoxique *in vitro* de l'eau de La Bourboule sur la toxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, XCV, 13.

G. BILLARD. Pouvoir anagotoxique des eaux minérales d'Auvergne sur la toxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, XCIV, 1236.

l'avons vu avec la spartéine, ne s'obtient qu'après une certaine incubation, l'optimum paraît être l'injection de toxine 7 à 10 jours après l'injection de Choussy.

7° *Le chloroforme protège contre les neurotoxines.* — Contre la spartéine tout d'abord :

« 1° Cobaye 400 grs. Injection de 8 mmg. de spartéine (témoin) pour 100 grs de poids : survie 21 minutes (spartéine Byla).

2° Cobaye 270 grs. Anesthésie 3 minutes, réveil 16 minutes après; injection de 6 milligrammes de spartéine 7 minutes après réveil : survie 36 minutes.

3° Cobaye 290 grs. Injection de spartéine suivie aussitôt d'anesthésie ; présente des accidents spartéiniques graves une demi-heure après et qui durent une heure, régressant rapidement. Deux heures après l'animal paraît normal.

4° Cobaye 310 grs. Anesthésie de 3 minutes 15 secondes. Injection de spartéine avant le réveil qui a lieu en 8 minutes ; survit après avoir présenté une légère parésie de la sangle abdominale.

Donc, l'action phylactique du chloroforme contre la spartéine est réelle, mais j'ai observé qu'elle dure peu et ne se manifeste que pendant l'anesthésie puisque sur un lot de 25 cobayes j'ai pu sauver seulement ceux traités à la spartéine pendant le sommeil ou ceux anesthésiés aussitôt après l'injection.

1° Cobaye, 370 gr. Injection de deux dixièmes de milligr. (témoin) de venin pour cent grammes = survie 14 h. 45'.

2° Cobaye, 300 gr. Anesthésie 3 minutes, et 12 minutes après, injection de deux dixièmes de milligr. de venin pour cent grammes = survie sans accidents remarquables.

3° Cobaye, 330 gr. Injection de venin et 10 minutes après anesthésie = mort en 9 heures.

Ici encore, le chloroforme a montré une action phylactique contre le venin, mais seulement préventive si l'on peut dire, et nous constatons en outre un fait déjà vu antérieurement avec le formol et la spartéine : c'est que les effets de l'influence curative sont néfastes et que la mort survient beaucoup plus vite dans ces cas que chez les témoins.

Phylaxie par le chloroforme contre la toxine diphtérique.

1° Cobaye. Mort par toxine diphtérique en 31 heures.

2^o Cobaye, 400 gr. Anesthésie à 17 h. 25. Injection de T. D. à 17 h. 40 = survie.

3^o Cobaye, 360 gr. Injection de T. D. à 17 h. et anesthésie à 17 h. 15 = mort en 16 heures.

Ici encore l'anesthésie préventive a été phylactique, mais cette anesthésie a été néfaste au point de vue curatif.

Phylaxie par le chloroforme contre la toxine tétanique. — Mes essais ont donné des résultats insuffisants, et ceci doit sans doute s'expliquer par la phylaxie fugace du chloroforme qui ne saurait arrêter l'invasion progressive mais lente de la toxine tétanique.

Essais de réalisation d'une anatoxine chloroformée. — Il est impossible de recueillir aseptiquement le venin des serpents ; aussi lorsqu'après l'avoir desséché on prépare des solutions titrées, celles-ci ne peuvent être conservées longtemps. On ne peut les stériliser par la chaleur, sous peine de modifier considérablement les qualités du venin et, si on les filtre sur bougie, celle-ci retient par absorption une partie du venin ou de ses éléments. J'ai un jour essayé d'en conserver en milieu chloroformé et aussi en milieu éthéré, et je me suis alors aperçu que, très rapidement, en quelques heures, la solution avait perdu la plus grande partie de sa toxicité. Celle-ci s'était-elle atténuée par vieillissement ou par des modifications d'ordre physico-chimique réalisées par le chloroforme, ou encore plus simplement par l'action phylactique *in vivo* de celui-ci ? L'expérimentation biologique paraît bien être en faveur de cette dernière hypothèse.

A. Un cobaye reçoit une dose de spartéine mortelle en 45 minutes, mélangée dans la seringue à 5 cc d'eau physiologique chloroformée. Il survit sans avoir présenté d'accidents spartéiniques.

B. Un cobaye reçoit deux dixièmes de milligr. de venin pour cent grammes mélangés dans la seringue à 5 cc. d'eau physiologique chloroformée. Il survit sans accidents remarquables.

C. Un cobaye de 310 gr. reçoit une injection de deux dixièmes de milligr. en eau physiologique chloroformée depuis 15 heures. Réagit très peu après la piqure et quelques heures après paraît normal.

D. Cobaye de 340 gr. Injection de trois dixièmes de milligr. de venin chloroformé (préparation datant de 40 heures). Survit sans accidents.

E. Cobaye de 300 gr. Injection de quatre dixièmes de milligr. de venin chloroformé (préparation datant de 96 heures). Survie 10 jours, alors que le témoin meurt en 6 heures.

F. Cobaye de 410 gr. Injection de cinq dixièmes de milligr. de venin chloroformé (préparation 120 h.)=Survie 7 jours.

G. Cobaye de 460 gr. Injection de un milligr. de venin chloroformé (préparation 120 h.)=Survie deux jours.

H. Cobaye de 310 gr. Injection de trois dixièmes de milligr. de venin chloroformé (168 h.)=Survie sans accidents. Cinq jours après, injection de trois dixièmes de milligr. de venin non chloroformé=Survie.

Certes, je n'ai pas la prétention d'avoir réalisé là une anatoxine chloroformée définitive, mais cette réalisation apparaît comme possible. » (1)

Le gardénal protège contre la toxine tétanique et le venin. — Le gardénal, ou phényl-éthyl-malonylurée, connu comme hypnotique et sédatif nerveux, a été employé comme substance phylactisante par M. Billard qui a obtenu les résultats suivants :

« A. Cobaye témoin. Injection de toxine tétanique : mort en 73 heures. Deuxième témoin, mort en 75 heures.

B. Le 22 août 1927, à 15 h., injection d'une dose analogue de toxine tétanique mélangée *in vitro* à un centigramme de gardénal Poulenc ; le 25 août, à 10 h., injection d'un centigramme de gardénal. Le 26 août, à 10 h., ingestion de un centigr. de gardénal (stupeur, torpeur). Survit sans autres accidents.

C. Trois autres cobayes traités de même (gardénal un centgr. pour 100 gr.).

Avec le venin de vipère nous avons obtenu les résultats suivants :

Le gardénal, injecté 5 ou 6 h. avant le venin, préserve les animaux contre l'envenimation jusqu'à la dose de 3 dixièmes de milligr. de venin pour 100 gr. d'animal.

Mélangé *in vitro* au venin, il préserve jusqu'à la dose de 5 dixièmes de milligr. pour 100 gr.

Après l'envenimation confirmée, ses effets sont défavorables. » (2)

(1) G. BILLARD, loc. cit. p. 51, 52 et 53.

(2) G. BILLARD, loc. cit. 55.

9° *Le bromhydrate de scopolamine inactive le venin de vipère et la toxine diphthérique.* — Injectée à la dose d'un dixième de milligr. pour 100 gr. de poids d'animal, la scopolamine empêche l'envenimation et l'intoxication diphthérique. (1)

10° *A côté de ces actions protectrices* il est certaines conditions d'application des mêmes substances qui aggravent, au contraire, l'intoxication expérimentale. Signalons, par exemple, que le témoin injecté à la spartéine meurt en 45 minutes, alors que l'injection d'uroformine, 15 minutes après la spartéine, fait mourir l'animal en 20 minutes.

L'anesthésie par le chloroforme, succédant à une injection de dose mortelle de venin, tue le cobaye en 9 heures, alors que le témoin (venin seul) survit 24 h. 45.

A un phénomène de phylaxie s'opposerait donc un phénomène obtenu avec les mêmes substances appliquées dans un ordre inverse, et que nous serions tentés d'appeler Antiphy-laxie.

*
* *

THÉORIE DE LA PHYLAXIE. — Tous ces faits que nous venons d'exposer d'une façon analytique, sont reliés par un même fil conducteur que Billard a le mérite d'avoir saisi et exprimé, sans aucun doute possible. Nous allons résumer les étapes du raisonnement qui conduit à sa théorie de la phylaxie.

La première interprétation qui vient à l'esprit, fait envisager une neutralisation du poison par adjonction simple du phylactique (adsorption ou combinaison chimique). Mais le seul fait que la phylaxie se manifeste pendant plusieurs jours, plusieurs semaines même, après l'injection de substances phylactiques suffit à écarter cette hypothèse. L'eau de Madeleine (Mont-Dore), injectée soit 15 minutes, soit 6 h., soit 1 jour ou même 3 semaines avant la dose mortelle de spartéine, préserve l'animal. On ne peut concevoir que l'eau minérale soit restée en circulation dans le sang pendant 20 jours pour former un composé eau minérale-spartéine dépourvu de toxicité. On est ainsi amené à concevoir une modification, par le phylactique, des éléments sensibles du système nerveux.

Les neurotoxines, pour atteindre l'élément vital de la cellule

(1) G. BILLARD, loc. cit. 54.

nerveuse, doivent, tout d'abord, imprégner cette cellule. Dans cette imprégnation, un rôle capital est dévolu aux constituants lipidiques de la cellule, car ces constituants sont des solvants des neurotoxines. La disposition anatomique de ces lipoïdes dans la cellule importe peu à la question physiologique ; il semble bien que la membrane d'Overton, limitant la cellule, ne puisse être soutenue actuellement ; les lipoïdes paraissent être disséminés dans le protoplasma, qu'ils y soient libres ou combinés intimement aux albumines. L'activité physiologique de ces éléments paraît considérable, à la suite de travaux comme ceux de Mayer et Schaeffer, qui établissent le rôle régulateur des lipoïdes dans l'inhibition du gel protoplasmique et dans les oxydations cellulaires.

Cette activité physiologique, Billard la conçoit également dans l'imprégnation de la cellule nerveuse, notamment, par certaines substances neurotoxiques et phylactiques. Mais, l'imprégnation pour ces deux ordres de substances ne s'ajoute pas arithmétiquement ; il semble, au contraire, que la « teinture » des lipoïdes par le phylactique empêche la fixation du toxique à condition, toutefois, que le premier ait été porté à la cellule avant le second. Les faits de déplacement d'un toxique déjà fixé sur la cellule par un phylactique, ne s'observent que rarement (il y a même renforcement de la teinture par le toxique si le phylactique arrive en second lieu) . Ainsi s'expliqueraient les phénomènes d'antiphylaxie. Cette conception vitale de la phylaxie est la seule qui donne une explication des données expérimentales relatées. Certaines substances phylactisantes ont une action bien connue sur les lipoïdes, tel le formol qui les précipite, le chloroforme qui les dissout. D'autres ont une action explicable par précipitation partielle des savons de l'organisme, d'où, mobilisation défectueuse de lipoïdes que les savons solubles maintiennent à l'état de solution ; ce serait le mode d'action des eaux minérales, qui phylactisent par modification des savons par leurs cathions bi et plurivalents. Les expériences de Billard et Laville démontrent ces faits d'une façon absolue. L'eau de Madeleine, du Mont-Dore, phylactise le cobaye contre la spartéine. L'eau de Madeleine, traitée par le palmitate et l'oléate de soude, ne phylactise plus ; l'eau traitée par le stéarate phyl-

lactise encore (1). L'interprétation de ces résultats paraît être logiquement la suivante : certains ions de l'eau minérale ont floclulé les savons comme ils l'auraient fait dans l'organisme ; c'est alors une eau privée de ces ions actifs, retenus dans le floclulat, qui est injectée à l'animal. La phylaxie par le gardénal est susceptible de la même interprétation.

En résumé, les substances phylactiques « teignent » ou modifient les lipoides de la cellule nerveuse, empêchant ainsi l'imprégnation de ces mêmes lipoides par les substances neurotoxiques. Il est à noter que l'action phylactique peut être exercée par une autre neurotoxine injectée à dose hypomortelle, aussi bien que par une substance dénuée de pouvoir toxique.

DÉFINITION DE LA PHYLAXIE ET FAITS QU'ELLE ENGLOBE. — Un corollaire de cette interprétation permet de définir la phylaxie, d'en limiter le champ. Les phénomènes de phylaxie ne sont possibles qu'entre deux substances ayant une fixation élective sur un même élément vivant. Toute action antagoniste qui ne répond pas à cette condition ne peut pas être qualifiée d'action phylactique. Un exemple concret illustre ce que nous venons d'écrire : on a signalé un antagonisme d'action entre l'adrénaline et l'yohimbine (2) ; l'une met en jeu un système nerveux vaso-constricteur, l'autre porte sur un système nerveux vasodilatateur ; la mise en jeu de ces deux actions opposées a un résultat nul sans qu'on puisse parler de neutralisation d'une substance par l'autre.

On ne saurait, non plus, faire entrer dans les phénomènes de phylaxie les antagonismes signalés par Loeb entre les ions K et Na, l'action nocive de l'un ou l'autre ne s'observant que dans des conditions de vie très éloignées de l'équilibre physiologique des humeurs.

S'éloignent également de la phylaxie les cas de neutralisation de poisons par des procédés physico-chimique : adsorption de poisons sur des colloïdes ou des particules très fines (charbon) ou même, comme nous le verrons, neutralisation des toxines par les savons.

(1) J. LAVILLE. Modification des Propriétés phylactiques des Eaux Minérales par les Savons et réciproquement de celles des Savons par les Eaux Minérales. Thèse doct. en pharmacie. Toulouse 1929.

(2) C. R. HAMET. Sur un nouveau cas d'inversion des effets adrénaliniques. *C. R. A. Sc.*, 1925, CLXXX, 2074.

Ainsi, dégagée de tout sujet de confusion, la phylaxie pourrait se définir : *Un phénomène d'antagonisme entre deux substances, l'une étant faiblement ou non toxique, l'autre étant toxique, introduites simultanément ou successivement dans l'organisme et portant leur action sur un même groupe d'éléments vivants de cet organisme.*

Avant que les phénomènes de phylaxie ou d'antiphylaxie aient été précisés dans leurs modalités, un grand nombre d'associations et d'oppositions de médicaments ou de poisons avaient été observées. Conformément à la définition donnée de la phylaxie, nous écarterons d'emblée une foule d'oppositions qui s'expliquent par la mise en jeu de deux groupes d'éléments, à fonctions antagonistes le plus souvent (opposition adrénaline-yohimbine p. ex.).

Un grand nombre d'actions antagonistes signalées nous paraissent cependant se rapporter à la phylaxie. E. Bardier et Stillmunkés (1) signalent que « le chloroforme renforce sur certains animaux, comme le chien, la sensibilité des centres bulbaires vis-à-vis de la cocaïne. Tel est le fait important à signaler au point de vue physiopathologique qui augmente d'un nouvel exemple le chapitre des associations médicamenteuses. »

La grande affinité du chloroforme et de la cocaïne pour le tissu nerveux réalise dans ce cas une antiphylaxie des plus nettes dont il conviendrait de rechercher les modalités, en faisant varier le moment d'application de l'un ou l'autre poison.

Ces mêmes auteurs ont signalé la fréquence des syncopes mortelles chez le chien chloroformé, par injection d'adrénaline durant l'anesthésie. L'administration préalable de quinine ou de quinidine empêche cette syncope adrénalino-chloroformique (2). Bien que proche, apparemment, des phénomènes que nous étudions, nous ne retenons pas ces faits comme exemples de phylaxie, la quinine ayant une action fonctionnellement antagoniste de celle de l'adrénaline sur le système sympathique, de sorte que, l'inhibition de la syncope adrénalino-chloroformique peut être due à une modification fonctionnelle préalable du système nerveux sympathique.

(1) E. BARDIER et STILLMUNKÉS. Sensibilisation bulbaire à la cocaïne par le chloroforme. C. R. Soc. Biol., 1926, XCIV, 118.

(2) E. BARDIER et STILLMUNKÉS. Quinine, quinidine et syncope adrénalino-chloroformique. C. R. Soc. Biol., 1926, XCIV, 268.

Anatoxines. — Au contraire, les faits signalés, surtout par Lôwenstein (3) et par Ramon (4), concernant les toxines modifiées par certaines substances, nous paraissent pouvoir entrer dans le cadre de la phylaxie. Berthelot et Ramon rapportent une longue liste de substances qui ont le pouvoir, agissant seules ou associées à la chaleur, de faire perdre à certains poisons ou toxines leur action nocive, de telle sorte, que plusieurs doses mortelles de ces poisons peuvent être injectées à l'animal sans provoquer les symptômes ordinaires d'intoxication. Fait remarquable, les injections répétées de ces toxines et poisons modifiés font apparaître les réactions de l'immunité, tout comme les toxines non modifiées. Cette propriété antigénique est à tel point persistante, que les premiers essais de toxines modifiées ont été faits surtout en vue de la production des sérums antitoxiques chez les animaux employés à cet effet. Ramon a donné le nom d'*anatoxines* à ces toxines ainsi modifiées.

Roux et Martin, dès 1894, avaient signalé l'atténuation de la toxine diphtérique par la liqueur iodo-iodurée de Gram et la possibilité de l'emploi de cette toxine pour la préparation des animaux producteurs d'antitoxine. Lôwenstein atténue la toxine tétanique par l'aldéhyde formique avant de l'injecter au cheval. Ramon a signalé la possibilité de préparer des anatoxines (toxines dépourvues de leur action toxique mais ayant conservé leur pouvoir antigénique) tétanique, diphtérique, botulinique, des anaérobies de la gangrène gazeuse (Weinberg, Gray, Prévot) de l'abrine, et du venin de cobra.

Les anatoxines sont obtenues par action, sur la toxine ou le poison, de substances très nombreuses. Berthelot et Ramon (2) signalent des acides (acétique, formique), des alcalis (ammoniaque), des alcools (éthylique, méthylique), des éthers, des aldéhydes (éthylique, crotonique, benzoïque), acroléine, paraldéhydes, acétone, acétals (méthylal), chloroforme, hexaméthylénetétramine, chloramine, quinosol, proflavine, fluorure de sodium, perborate de soude, persulfure de potasse.

(1) LÖWENSTEIN. *Deutsch. Médiz. wochensch.*, 1921.

(2) G. RAMON. Sur l'anatoxine diphtérique et les anatoxines en général. *Ann. I. P.*, 1925, XXXIX.

(3) ROUX et MARTIN. Sérumthérapie de la diphtérie. *Ann. I. P.*, 1894, VIII.

(4) BERTHELOT et G. RAMON. Sur les agents de transformation des toxines en anatoxines. *C. R. Ac. Sc.*, 1925, CLXXX, 341.

Un point important, c'est que les toxines doivent être laissées en contact pendant plusieurs jours, ou même plusieurs semaines avec ces substances anatoxigènes.

Il y a une ressemblance très marquée entre les faits de phylaxie que nous avons rapportés et le mode d'action des anatoxines : même suppression de la toxicité, même propriétés immunisantes. Ces ressemblances peuvent-elles être poussées jusqu'à l'identité ? Le cas du formol est assez démonstratif à cet égard. Trois neurotoxines ont été étudiées par Billard : spartéine, toxine diphtérique, et venin de vipère. Une action phylactique très manifeste vis-à-vis de ces poisons, est exercée par des substances capables de libérer du formol dans l'organisme (hexaméthylènetétramine ou uroformine, ou anatoxine tétanique). Rappelons simplement que l'injection d'uroformine, 15 minutes avant l'injection d'une dose supérieure à la dose mortelle de spartéine, préserve totalement l'animal. Le mélange, *in vitro*, d'anatoxine tétanique et de spartéine n'est pas mortel. C'est le formol de l'anatoxine qui agit, le mélange de la toxine tétanique avec la spartéine étant toxique comme la spartéine seule.

Le mélange *in vitro*, sans temps de contact, d'anatoxine tétanique et de toxine diphtérique à dose mortelle n'est pas toxique. Là, encore, c'est le formol de l'anatoxine qui agit car, si la toxine tétanique injectée au préalable protège contre la toxine diphtérique, le mélange toxine tétanique (dose non mortelle), toxine diphtérique (dose mortelle) conserve sa toxicité normale.

L'injection d'uroformine 15 minutes après le venin de vipère empêche les accidents neurotoxiques, l'hémorragie du venin n'étant pas atténuée.

On peut donc empêcher l'action de certains poisons neurotoxiques, non plus par action du formol sur le poison, comme dans la préparation des anatoxines, mais par action du formol lui-même sur l'organisme, avant, après, ou au moment même où cet organisme est soumis à l'action du toxique.

Devant ces faits, on est en droit de se demander si la toxine est vraiment modifiée par le formol, comme le pensent Ramon et ses collaborateurs. Ne semble-t-il pas, au contraire, que le formol coéxistant (combiné ou non à certains éléments organiques) à côté de la partie active de la toxine, se libère en même

temps que celle-ci, « teint » les cellules nerveuses, les empêche d'être imprégnées par le poison. Cette action du formol ne s'exerce que vis-à-vis des éléments nerveux, laissant la possibilité de toutes les réactions humorales normales.

Conçues de cette façon, les anatoxines formolées rentrent dans le cadre de la phylaxie. Ce ne sont pas seulement les anatoxines formolées, mais aussi celles obtenues par action du chloroforme, qui sont explicables par la théorie de Billard. L'étude systématique de toutes les substances anatoxigènes montrerait peut-être qu'elles sont toutes douées du pouvoir phylactique.

Cryptotoxines. — Vincent a décrit dans ces dernières années un mode de traitement des toxines qui les rend inoffensives, même à dose plusieurs fois mortelles, tout en laissant subsister leurs propriétés antigéniques. A ces toxines, ainsi dissimulées, mais non détruites, Vincent a donné le nom de *cryptotoxines* (1).

Ces cryptotoxines sont obtenues à l'aide de plusieurs substances. Nous laissons de côté, pour le moment, les cryptotoxines obtenues à l'aide des colloïdes, comme les savons, ne retenant que celles obtenues avec des non colloïdes, tels que le salicylate de soude (2). Ces cryptotoxines nous paraissent réalisables autrement que par le contact prolongé du salicylate avec le poison. Nous avons pratiqué des injections de salicylate de soude en solution glucosée ; elles préservent le cobaye contre une dose 2 fois mortelle de venin de vipère. Cette préservation a lieu par l'injection du salicylate 15 minutes avant le venin, aussi bien que par le mélange *in vitro* de salicylate-venin. Là, encore, il ne paraît pas y avoir action directe du salicylate sur le poison, mais, au contraire, une modification de l'organisme telle qu'il ne peut plus être touché par la neurotoxine. Nous montrerons plus loin que le salicylate se fixe sur les lipoïdes ; rappelons également que sa dissolution dans les corps gras est bien connue. Tous ces faits incitent à penser que les cryptotoxines salicylées, de même que les anatoxines, procèdent par un mécanisme commun qui est celui de la phylaxie.

(1) H. VINCENT. Sur les propriétés générales des cryptotoxines en particulier de la cryptotoxine tétanique. *C. R. Ac. Sc.*, 1926, CLXXXII, 1307.

(2) H. VINCENT. Sur quelques substances non colloïdales à propriétés cryptotoxiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1928, CLXXXVI, 1175.

Les cryptotoxines obtenues à l'aide de substances colloïdales — les savons notamment — ont un mode d'action vraisemblablement différent de celui que nous invoquons pour les cryptotoxines salicylées.

Il y a, dans ce cas, neutralisation vraie de la toxine, due à une combinaison de celle-ci avec le savon, par adsorption, probablement (Sédaillan et Velluz) (1). Le nouveau composé injecté à l'animal n'est pas toxique, et les éléments nerveux n'ont aucune part active dans le phénomène de protection.

Les faits rapportés récemment par Joannidès sur une propriété anatoxique du lait nous paraissent susceptibles de la même interprétation que les cryptotoxines obtenues à l'aide des savons. Pour le mélange *in vitro* de toxine tétanique ou de toxine diphtérique avec du lait frais, stérilisé, cet auteur a vu qu'il se forme un nouveau composé atoxique doué cependant de propriétés antigéniques spécifiques. Mais le contact du lait et de la toxine est nécessaire, l'injection de lait en un point du corps autre que le lieu d'injection de la toxine ne préserve pas l'animal des accidents. Cette restriction seule suffit à prouver qu'il ne s'agit pas d'un phénomène de phylaxie ; il est beaucoup plus probable qu'il y a adsorption de la toxine par les colloïdes albuminoïdes ou lipoides du lait (2).

Quoique bien nettement limités, les phénomènes de la phylaxie embrassent un grand nombre de faits expérimentaux connus. La conception de la Phylaxie, telle que l'a envisagée Billard, permet le groupement de ces faits épars et permet, surtout, une compréhension du mode intime d'actions, en apparence diverses, inexplicables. Il est un point capital dans la théorie de Billard : c'est l'imprégnation partielle des lipides par les substances phylactisantes ou toxiques. Tout, dans leur action physiologique, semble prouver que les corps phylactisants anatoxigènes ou cryptotoxigènes (non colloïdaux) ainsi que les neurotoxines étudiées sont fixés par ces lipides. Mais il reste à

(1) P. SÉDAILLAN et H. VELLUZ. Sur le mécanisme d'action des acides gras et, en particulier, des acides non saturés et de leurs savons sur les bactéries et leurs toxines. *Bull. Soc. de Chimie Biol.*, 1927, IX, 825.

(2) G. JOANNIDÈS. — Action du lait sur le système hemolytique. *Ann. I. P.*, 1927, XLI, 61.

— Le lait substance anatoxigène ? *C. R. Soc. Biol.*, 1925, XCIII, 1210.

donner la démonstration expérimentale de cette fixation. Elle a été faite pour plusieurs toxines (tétanique et diphtérique) ainsi que pour le venin de cobra.

Continuant ces séries de recherches nous apporterons des preuves expérimentales concernant la fixation de la toxine tétanique du venin de vipère, de la spartéine et du salicylate de soude par les lipides de la substance nerveuse et des globules rouges.

Profondément persuadés, en outre, du rôle éminent de la barrière lipoidique dans l'imprégnation des cellules sensibles par les substances phylactiques et toxiques, nous avons repris l'étude des actions phylactiques sur des éléments chez lesquels le rôle des lipoides est plus facile à saisir. Le globule rouge, vulnérable par lésion de ses composants lipidiques, nous a offert un procédé d'étude commode. Un grand nombre de substances sont hémolytiques par suite de leur dissolution dans les lipides qui entourent le globule ou font partie de sa structure. Or nous avons réussi à empêcher cette hémolyse par l'action simultanée ou successive de substances agissant, elles aussi, sur les lipides. N'est-ce point là une véritable phylaxie au sens étymologique du mot ?

PREMIERE PARTIE



Fixation

des substances neurotoxiques sur les éléments et, plus spécialement, sur les lipides constitutifs du tissu nerveux

Cette première partie sera réservée à l'exposé des données actuellement acquises sur la possibilité, pour les lipides du tissu nerveux, de fixer les neurotoxines et leurs phylactiques. Nous ne séparerons pas ces deux ordres de substances dans l'étude que nous allons en faire, car beaucoup de phylactiques peuvent être toxiques à certaines doses et inversement (spartéine, toxine tétanique, formol, chloroforme).

Nous compléterons ces données par les résultats expérimentaux que nous avons obtenus relativement à la fixation de la toxine tétanique, du formol, du venin de vipère et du sulfate de spartéine.

I. FIXATION DE LA TOXINE TÉTANIQUE

C'est par cette neurotoxine que nous commencerons, car c'est par des recherches sur sa fixation que s'est ouvert tout un cycle de travaux, démontrant l'affinité de certains poisons pour le système nerveux.

L'expérience princeps sur cette opération est due à Wassermann et Takaki (1) qui, dès 1898, ont démontré la fixation élective de la toxine tétanique sur la substance cérébrale. Ces auteurs ont mélangé et laissé en contact, *in vitro*, des émulsions de cerveau avec des doses de toxine tétanique plusieurs fois

(1) WASSERMANN et TAKAKI. *Über Tetanus antitoxische Eigenschaften der Centralnervensystems. Berlin Klin. Wochenschr.* 1898. I.

mortelles pour la souris blanche. L'injection intrapéritonéale de ce mélange à l'animal ne produit aucun des effets toxiques habituels de la toxine. Ces observations furent confirmées par A. Marie (1) qui en précisa certaines conditions expérimentales. Ces expériences, et celles de Metchnikoff sur le même sujet montrèrent, en outre, que la substance nerveuse ne détruit pas la toxine mais la retient, par adsorption vraisemblablement.

Les auteurs se préoccupèrent ensuite de déterminer quel est le constituant du système nerveux qui fixe la toxine. Morax et Marie (2) pensent que cette substance est de nature protéique, parce que présentant tous les caractères de coagulabilité et de précipitation de ces corps. Landsteiner et Botteri (3) ont montré cependant, peu après, que le protagon a un pouvoir neutralisant très marqué. Takaki (4) en 1908, a repris l'étude de ces phénomènes et a trouvé que l'alcool enlève à la substance nerveuse son pouvoir fixateur et que l'extrait alcoolique (contenant les lipoides) a ce pouvoir à un degré très marqué.

Guy Laroche et A. Grigaut (5) distinguent le pouvoir fixateur et le pouvoir neutralisant du tissu nerveux vis-à-vis de la toxine tétanique et reconnaissent un pouvoir fixateur beaucoup plus marqué pour les albumines.

Les expériences de L. Petit apportent une opinion voisine de celle de Takaki et de celles de Landsteiner et Botteri : Le venin de cobra n'est hémolytique qu'en présence de lécithine. Les substances avides de lécithine empêchent l'hémolyse (réaction de Calmette). Or la toxine tétanique présente ce caractère d'empêcher l'action hémolytique du venin, d'où, il est logique de conclure à une affinité particulière de la toxine tétanique pour la lécithine.

(1) A. MARIE. Sur les propriétés antitétaniques des centres nerveux. *Ann. I. P.*, 1988.

(2) MORAX et MARIE. Note sur les propriétés fixatrices de la substance cérébrale desséchée. *Ann. I. P.* 1908, XXII.

(3) LANDSTEINER et BOTTERI. Über Verbindung von Tetanustoxin mit Lipoiden. *Centralbl. fur. Bakt.* 1906 LXII (6).

(4) TAKAKI. Ueber Tetanusgift bindende Bestandteile des Gehirns. *Beitr. z. chem. Ph. u. Path.* 1908 (in G. Laroche et Grigaut).

(5) G. LAROCHE et A. GRIGAUT. Etudes biologiques et chimiques de l'adsorption des toxines dipht. et tétanique. *Ann. I. P.* 1911-XXV.

L. Petit (1) a trouvé également que le mélange toxine tétanique-lécithine injecté à l'animal n'est pas toxique. La toxine tétanique est hémolytique à certaines concentrations, mais la cholestérine empêche cette action, ainsi qu'il ressort des expériences de Cernovodeanu et Victor Henri (2). D'autres substances grasses, et surtout l'extrait éthéré de sérum antitétanique, ont également, d'après ces auteurs, un pouvoir neutralisant vis-à-vis de la tétanolysine (substance hémolytique de la toxine).

Dans le même ordre d'idée, nous avons fait quelques recherches sur le pouvoir antitétanolitique de certains lipides globulaires.

Nous avons procédé à l'extraction des lipides d'hématies de mouton par une technique que nous exposerons plus loin (p. 61). Disons simplement, ici, que nous obtenons tout d'abord des lipides acéto, puis alcool, (alcool méthylique) enfin, éthersolubles. Ces lipides sont mis en solution colloïdale dans le sérum physiologique à 9 p. 1000.

La présence de ces lipides à côté des globules empêche l'action hémolytique de la toxine tétanique.

Dans 0 cc. 10 et 0,05 de toxine tétanique fraîche diluée au tiers à laquelle on ajoute 0,05 et 0,10 de sérum physiologique, nous mettons 0, cc. 05 de suspension de globules de cheval à 1 p. 40 ; l'hémolyse est assez rapide. Dans les autres tubes, nous remplaçons le sérum physiologique par une suspension de lipides et, après contact de 5 minutes entre les lipides et la toxine, nous ajoutons les 0, cc. 05 de suspension globulaire.

Le tableau suivant résume nos résultats :

G. R. cheval 0,05										
Tox. téta. au 1/3	0,10	0,50	0,10	0,05	0,10	0,05	0,10	0,05	0,10	0,05
Eau Physiol.	0,10	0,15							Mél.	Mél.
Lipides			Acét. 0,10	Acét. 0,15	Alco. 0,10	Alco. 0,15	Eth. 0,10	Eth. 0,15	3 Lip. 0,10	3 Lip. 0,15
Hémoly. ap. 4 h.	H3	H2	H0	H0	H0	H0	H1	H0	H0	H0
Hémoly. ap. 12 h.	H6	H6	H0	H0	H1	H0	H1	H0	H0	H0

(1) L. PETIT. Sur les propriétés lécithinophiles des toxines tétanique et diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1908, LXIV, 841.

(2) CERNOVODEANU et Vict. HENRI. Recherches sur la toxine et l'antitoxine tétaniques. *C. R. Soc. Biol.*, 1907, LXII, 392.

L'expérience s'est poursuivie à la température du laboratoire : 15°. La lecture des degrés d'hémolyse a été faite suivant une échelle arbitraire, analogue à celle de Vernes, allant de 0, hémolyse nulle, à 8, hémolyse totale.

Les lipides acéto solubles; alcoolo solubles et éthéro solubles, ainsi que le mélange extrait des globules rouges, entravent donc le pouvoir hémolytique de la toxine. Il nous semble logique d'attribuer cette neutralisation à une fixation de la tétanoly-sine sur les lipides.

Outre l'intérêt qu'elles présentent au point de vue du mécanisme de l'hémolyse, ces expériences ont été précieuses car elles nous ont conduit dans une voie féconde en résultats.

En effet, nous avons mis en contact cette même toxine tétanique avec les lipoides globulaires et nous l'avons vue perdre ainsi sa toxicité pour l'animal : Cobaye n° 951, injection intrapéritonéale d'une dose mortelle de toxine tétanique (3/10 de cc. de toxine à 1/5000 pour 100 gr. d'animal) additionnée de 1 cc. de sérum physiologique : mort en 70 heures.

Cobaye n° 952, une dose mortelle de toxine tétanique (3/10 de cc. de toxine à 1/5000 pour 100 gr. d'animal) est mélangée, *in vitro*, avec 1 cc. de suspension colloïdale de lipoides alcoolo-solubles de globules rouges de mouton. La durée du contact est de 15 minutes à la température du laboratoire (15°). Le mélange est injecté dans le péritoine de l'animal : survie sans accidents.

Cette expérience nous permet deux conclusions importantes : la première est que les actions hémolytiques et neurotoxiques de la toxine sont dues à une même substance et que par l'étude de la « tétanolsine » on peut être renseigné sur la toxine tétanique entière.

La seconde, plus importante pour la thèse que nous soutenons, est que la même toxine tétanique se fixe — puisqu'elle est neutralisée — sur les lipides alcoolo-solubles qui, selon notre procédé d'extraction, (voir p. 61) sont surtout des phosphatides. Cette conclusion établit un argument de plus en faveur de l'action du poison sur le système nerveux par l'intermédiaire des constituants lipidiques, et s'ajoute aux preuves déjà apportées par les auteurs.

On pourra nous objecter que les lipides globulaires ne sont pas les mêmes que les lipides nerveux ; mais la fixation n'a

pas lieu ici sur un tissu ayant gardé son individualité mais bien sur un groupe chimiquement isolé. Nous avons tenté un assez grand nombre d'expériences sur l'animal pour rechercher le pouvoir fixateur des lipides extraits de la moelle de veau pour la toxine tétanique. Le mélange fait *in vitro*, de différents lipides avec la toxine (contact de 15 minutes) était injecté dans le péritoine du cobaye. Les animaux injectés avec le mélange mouraient aussi rapidement que le témoin soumis à la toxine pure. Nous n'avons pu sauver aucun animal.

Le fait qu'il n'y a pas eu neutralisation dans ce cas, n'implique pas qu'il n'y ait pas eu fixation, mais nous n'avons pas recherché cette fixation d'une façon directe, seule technique permettant le contrôle (voir chapitre suivant, p. 28).

La seule conclusion qu'il nous soit donc permis de tirer de nos expériences sur ce point est la suivante : les lipoides alcool-solubles du globule rouge de mouton neutralisent la toxine tétanique dans ses effets hémolytiques et neurotoxiques. La neutralisation implique la fixation ; celle-ci se fait sur un groupe chimique défini (phosphatides).

II. FIXATION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE.

La clinique donnait déjà à penser que le poison diphtérique, sécrété par un bacille bien localisé, était porté surtout sur les centres nerveux. Cette façon de penser résultait des observations de paralysies isolées et de mort par une sorte de curarisation progressive.

C'est seulement en 1911 que les premières études expérimentales systématiques furent entreprises par Laroche et Grigaut (1). Ces auteurs ont montré un pouvoir fixateur énergique de la substance nerveuse pour la toxine. Ils laissent un poids assez faible de substance cérébrale (0 gr. 50) en contact pendant 12 h. à la glacière, avec une solution de toxine diphtérique. Le fragment de tissu nerveux est ensuite lavé plusieurs fois, pour éliminer toute la toxine libre, puis injecté sous la dure-mère d'un cobaye. L'animal meurt d'intoxication diphtérique en un temps très court. Il y a donc eu fixation énergique du poison

G. LAROCHE et A. GRIGAUT. — Etude biologique et chimique de l'absorption des toxines tétanique et diphtérique par la substance nerveuse. *Ann. I. P.* 1911, XXV, p. 898.

sur le tissu nerveux, mais aucun pouvoir neutralisant. Il semble cependant qu'avec des masses de matières cérébrales plus considérables il y ait neutralisation de la toxine.

Parmi les constituants du tissu nerveux, ce sont les phosphatides et le protagon qui jouissent du pouvoir fixateur le plus marqué ; la cholestérine et les matières protéiques sont inactives.

Laroche et Grigaut signalent en outre qu'à côté de ce pouvoir fixateur, ces substances possèdent un pouvoir activant vis-à-vis de la toxine. Le mélange lécithine-toxine tue l'animal beaucoup plus rapidement que la même dose de toxine pure. Le grand mérite de ces auteurs est d'avoir différencié nettement le pouvoir fixateur du pouvoir neutralisant. Cette notion que l'on peut élever à la généralisation, commande une grande circonspection dans l'interprétation des résultats expérimentaux relatifs à un semblable sujet. Il nous paraît cependant logique d'admettre que si la fixation n'entraîne pas la neutralisation, la neutralisation, au contraire, implique la fixation. De sorte que, si une substance ajoutée à un poison empêche les manifestations toxiques de ce mélange injecté à l'animal, on est en droit de conclure qu'elle a fixé le poison. Mais, si une substance ajoutée à un poison n'empêche pas les manifestations toxiques après injection de ce mélange à l'animal, on n'est pas en droit de conclure qu'il n'y a pas eu fixation du poison. Dans ce dernier cas, le contrôle doit être institué comme l'ont fait Laroche et Guigaut : la substance immergée dans le poison s'en imprégnera et pourra le libérer une fois introduite dans l'organisme de l'animal.

Des expériences de Laroche et Grigaut, il convient de rapprocher celles de L. Petit (1) que nous avons signalées à l'occasion de la fixation de la toxine tétanique. Une faible dose de toxine diphtérique empêche l'hémolyse par le venin de cobra en présence de lécithine. La toxine diphtérique se fixe donc sur la lécithine qu'elle immobilise. Ce phénomène est cependant quantitativement moins marqué qu'avec la toxine tétanique.

La fixation de la toxine diphtérique sur les lipides du tissu nerveux est un fait qui ne paraît pas contesté à l'heure actuelle.

(1) L. PETIT. Sur les propriétés lécithinophiles des toxines tétanique et diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1908, LXIV, p. 841.

III. FIXATION DU FORMOL

Il n'existe que très peu de documents physiologiques relatifs à la fixation du formol sur tel ou tel tissu. Un important mémoire de J. Gautrelet et Olimpia Vechiu (1) apporte cependant des conclusions précises concernant l'affinité du formol pour le système nerveux. Ces auteurs ont démontré que l'action de l'aldéhyde formique sur le cœur (ralentissement et hypotension) a lieu par l'intermédiaire des centres nerveux modérateurs du cœur et vaso-dilatateurs. Pour ce qui est de l'action du formol sur le rein et la circulation périphérique il semble qu'elle soit due à une action paralysante vis-à-vis des terminaisons sympathiques vasculaires.

La précision de ces données expérimentales permet déjà d'affirmer la fixation *in vivo* du formol sur le système nerveux.

La grenouille intoxiquée par l'aldéhyde formique meurt rapidement après une phase courte d'excitation motrice. Bientôt les membres antérieurs faiblissent et la grenouille complètement prostrée entre dans la phase de torpeur. La respiration pulmonaire s'arrête et l'animal meurt peu après. Une dose de 0 gr. 003 d'aldéhyde formique injectée sous la peau est mortelle en 1 h. 1/2 pour une grenouille de poids moyen.

Le tableau de l'intoxication révèle un poison nerveux. Quant à la démonstration directe de la fixation du formol sur le tissu nerveux, nous n'avons pas trouvé d'expériences antérieures à celles que nous allons rapporter.

Nous avons mélangé *in vitro* le formol avec des fragments de moelle de veau, avec des suspensions colloïdales de lipides extraits de la moelle de veau et avec des solutions colloïdales de sérumalbumine purifiée (par le sulfate d'ammoniaque). Les mélanges étaient laissés en contact pendant 24 à 35 h. Nous n'avons jamais observé d'atténuation du pouvoir toxique de ces mélanges, attestant une neutralisation du formol. Une particularité est cependant à remarquer : une grenouille injectée avec le mélange formol-moelle meurt dans le même temps que

(1) J. GAUTRELET et OLIMPIA VECHIU. Action du formol sur le système nerveux végétatif. *Ann. de Physiol. et de Physico-chimie biol.* 1928 (1), IV, p. 129.

le témoin, mais ne présente pas de phase d'excitation motrice. Les grenouilles ayant reçu les mélanges albumine-formol et lipides-formol, présentent cette phase d'excitation comme le témoin. Cette remarque donne à penser que le formol injecté avec la moelle n'est pas à l'état libre comme dans les autres mélanges et qu'il n'est libéré que peu à peu, réalisant ainsi une intoxication par fractions successives et rapprochées, dont le résultat est la mort sans qu'apparaissent les effets excito-moteurs provoqués par la même dose injectée d'une façon massive.

Pour élucider ce point, après avoir lavé plusieurs fois dans l'eau physiologique des fragments de moelle ayant été en contact avec le formol, nous les avons injectés sous la peau d'une grenouille. L'animal a résisté à cette injection sans présenter aucun phénomène d'intoxication. Il semble donc qu'il n'y a pas eu fixation de formaldéhyde par le tissu nerveux à l'état cadavérique tout au moins.

Les affinités chimiques du formol pour les albumines sont bien connues ; nous n'avons pas trouvé mention d'actions possibles de ce corps sur les graisses et les lipoides.

La fixation du formol sur le tissu nerveux est donc probable, d'après les observations d'empoisonnements et d'après les expériences de J. Gautrelet et O. Vechiu ; mais nous n'avons pas réussi à la démontrer directement.

IV. FIXATION DU VENIN DE VIPÈRE

Injecté dans le péritoine, à la dose de 0 gr. 0001 pour 100 gr. d'animal, le venin de *vipera aspis*, tue le cobaye en 20 h. Les accidents apparaissent aussitôt après l'injection et consistent d'abord en manifestations rappelant celles d'un choc anaphylactique léger : agitation, secousses brèves de la tête, piétinement. Puis, l'animal entre en stupeur et progressivement apparaissent des parésies débutant par le membre inférieur. L'animal bientôt incapable de se tenir sur ses pattes, se couche, la respiration se ralentit et la mort arrive après cette phase de collapsus.

Les premiers accidents suivant immédiatement l'injection sont dus à l'hémorragine du venin ; les autres, au contraire, sont causés par la neurotoxine. Ce dernier poison semble donc se fixer électivement sur le système nerveux. M. Phisalix, qui a

étudié l'action du venin de vipère chez les animaux de plus grande taille que le cobaye, chez le chien par exemple, a pu dissocier les divers temps de la marche de l'atteinte du système nerveux. Cet auteur conclut que le « venin attaque d'abord les centres bulbo-médullaires, puis le cerveau, laissant intact pendant un certain temps, les nerfs ». (1)

L'observation clinique de cette intoxication a été complétée par l'examen histologique du tissu nerveux (2). C. Phisalix, H. Claude et A. Chouin ont trouvé : 1^o des altérations des nerfs (segmentation de la myéline, cylindraxe irrégulier, tuméfié par place) ; les nerfs des membres antérieurs sont les plus atteints.

2^o Des altérations de la substance grise de la moelle, granulations volumineuses dans la cellule autour d'un noyau augmenté de volume ou encore cellule colorée uniformément sans qu'on puisse distinguer le noyau. Le maximum des lésions se trouve dans les régions lombaires et sacrées. Des lésions semblables existent, en moins grande abondance dans les régions bulbaire et protubérantielle.

Pour ce qui est de la démonstration directe de la fixation du venin de vipère sur le tissu nerveux et sur les lipoides de ce tissu, il n'y a que peu d'expériences. C. Phisalix a cependant mis en évidence la propriété antivenimeuse de la cholestérine contre le venin de vipère.

Les venins d'autres serpents (ancistrodon, cobra) ont au contraire été étudiés très en détail à ce point de vue. Flexner et Noguchi (3) ont montré que la toxicité du venin d'ancistrodon disparaît quand on le mélange avec des fragments de matière cérébrale d'animaux sensibles. Le liquide surnageant après centrifugation n'est plus toxique. Calmette a fait les mêmes observations en ce qui concerne le venin de cobra.

En collaboration avec M. G. Billard, nous avons entrepris toute une série de recherches expérimentales que nous allons exposer et qui montrent la fixation élective du venin de *Vipera aspis* sur le tissu nerveux et ses lipides.

(1) Marie PHISALIX. Animaux venimeux et venins. 1922, II., p. 548.

(2) C. PHISALIX, H. CLAUDE et A. CHOUIN. Lésions du système nerveux dans un cas d'intoxication expérimentale par le venin de vipère. *C. R. Soc. Biol.*, 1898. L. p. 397.

(3) in Marie PHISALIX. loc. cit., p. 593.

A/ Pouvoir fixateur de la moelle de veau et absence de cette propriété pour la moelle de porc.

Cobaye n° 578 ♂ pesant 310 gr. On fait un mélange de 5 gr. de moelle de veau broyée avec 3 mmgr. de venin dissout dans l'eau physiologique. Après un contact de 24 h. on prélève la quantité correspondant à une dose de venin de 2/10 de milligr. pour 100 gr. d'animal. Ce liquide est injecté dans le péritoine de l'animal qui survit.

Un cobaye témoin est mort en 25 h. après avoir reçu la même dose de venin pur.

La moelle de porc — animal réfractaire au venin de vipère — ne paraît pas fixer la neurotoxine.

Cobaye n° 869 ♂ 370 gr. — 3 gr. de moelle de porc broyées dans de l'eau physiologique non centrifugés, sont mélangés avec une solution de venin. Après 15 minutes de contact on injecte dans le péritoine de l'animal une quantité correspondant à 2/10 de milligr. de venin par 100 gr., mort en 8 heures.

Cobaye n° 870 ♂ 320 gr. — 3 gr. de moelle de porc broyées dans de l'eau physiologique et centrifugés sont mélangés à une solution de venin. Après 15 minutes de contact, on injecte dans le péritoine de l'animal une quantité correspondant à 2/10 de milligr. de venin par 100 gr. : mort en 24 heures.

Cobaye n° 871 ♂ 500 gr. *Témoin*. On injecte dans le péritoine de l'animal une solution de venin correspondant à 2/10 de milligr. de venin par 100 gr. : mort en 36 heures.

B/ Pouvoir fixateur des lipides du tissu nerveux.

Avant de donner les résultats expérimentaux relatifs à cette fixation, nous devons exposer la technique que nous avons suivie dans l'extraction des lipides du tissu nerveux.

Les moelles de veau ou de porc obtenues très peu de temps après la mort de l'animal sont dépouillées de leurs enveloppes méningées et lavées au sérum physiologique pour les débarrasser le mieux possible du sang qu'elles contiennent. Elles sont fragmentées finement au bistouri et mises dans l'acétone pure pendant une semaine. Le flacon rigoureusement bouché est fréquemment agité pour augmenter le contact et l'action de l'acétone.

Après une semaine, on sépare l'acétone de la substance nerveuse par filtration sur papier suivie d'un lavage à l'acétone.

Ces mêmes fragments de tissu nerveux sont mis ensuite dans l'alcool méthylique à 99° et laissés en contact pendant une semaine à la température ordinaire.

On élimine l'alcool méthylique par le même procédé que l'acétone. La substance nerveuse ainsi épuisée par l'acétone et l'alcool méthylique est mise en présence d'éther. Après un contact d'une semaine encore, on filtre.

Les filtrats ainsi obtenus, acétone, alcool et éther sont évaporés dans le vide et laissent un dépôt de matière cireuse variant de consistance et de couleur suivant le solvant et, aussi, dans une certaine mesure, suivant l'espèce considérée.

Ces dépôts sont constitués par les lipoides et les graisses de la moelle. L'acétone porte son action sur les graisses qu'elle entraîne dans leur presque totalité, et aussi sur les lipoides non phosphorés dont elle dissout une partie. L'alcool méthylique enlève la quasi totalité des phosphatides. L'éther arrivant ensuite sur un terrain débarrassé de graisses et de phosphatides semble devoir entraîner surtout les lipoides non phosphorés.

L'appréciation de la qualité chimique des lipoides ainsi extraits nous est surtout suggérée par la considération des propriétés physiques des différents lipides. Mais, outre que tous les corps ayant les caractères des lipoides ne nous sont pas connus à l'heure actuelle, nos procédés d'extraction sont rudimentaires, l'épuisement pour chacun des solvants n'ayant pas été poussé très loin et le nombre des solvants ayant été limité à trois. Aussi pour indiquer surtout la caractéristique dominante dans la constitution de chacun de ces lipides, nous les désignerons par le nom de leur dissolvant, nous dirons ainsi lipides acéto, alcoolo, et éthérosolubles.

Les lipides desséchés dans le vide sont ensuite repris par l'eau physiologique où ils forment une solution colloïdale. L'excès non dissout est séparé de la solution par une centrifugation énergique.

C'est à l'aide de ces solutions de lipides que nous avons entrepris nos recherches sur la fixation du venin de vipère.

Voici le détail de ces travaux :

Cobaye n° 744 ♂ 480 gr. A une dose 4 fois mortelle de venin

de vipère (4/10 de milligr. par 100 gr. d'animal) est mélangée dans la seringue, la solution de lipides acéto-soluble de moelle de veau, à raison de 1/10 de cc. par 100 gr. d'animal. Les deux substances sont laissées en contact pendant 5 minutes et injectées dans le péritoine de l'animal : survie sans accidents.

Cobaye n° 745 ♂ 550 gr. Dans les mêmes conditions que précédemment, la dose 4 fois mortelle de venin est mélangée à une solution de lipoïdes alcoolo-soluble de moelle de veau (1/10 de cc. par 100 gr. Injection intrapéritonéale : mort en 12 heures.

Cobaye n° 746 ♂ 350 gr. Dans les mêmes conditions on mélange le venin à une solution de lipoïdes éthéro-solubles de moelle de veau. (1/10 de cc. par 100 gr.) Injection intrapéritonéale : survie sans accidents.

Il y a donc dans les constituants lipidiques du tissu nerveux deux groupes qui ont la faculté de fixer le venin de vipère d'une façon très énergique. Nous avons étudié l'action des extraits lipidiques de la moelle de porc. Ce tissu nous l'avons vu, ne fixe pas le venin, ce qui s'explique par le fait que l'animal est réfractaire à l'envenimation.

Cobaye n° 741 ♂ 510 gr. Comme pour la série précédente, on mélange le venin à dose 4 fois mortelle avec une solution de lipides acéto-solubles de moelle de porc (1/10 de cc. par 100 gr.). Après un contact de 5 minutes on injecte ce mélange dans le péritoine de l'animal : mort en 3 heures.

Cobaye n° 742 ♂ 340 gr. On met en présence dans les mêmes conditions que précédemment le venin et la solution de lipoïdes alcoolo-solubles de moelle de porc (1/10 de cc. par 100 gr.). Injection intrapéritonéale : survie sans accidents.

Cobaye n° 744 ♂ 480 gr. Mélange de venin aux mêmes doses que pour 741 et 742 avec la solution de lipoïdes éthéro-solubles de moelle de porc (1/10 de cc. par 100 gr.). Contact 5 minutes. Injection intrapéritonéale : survie sans accidents.

Cobaye n° 747 ♂ 350 gr. *Témoin pour ces deux dernières séries.* Injection intrapéritonéale de 4/10 de milligr. de venin par 100 gr. d'animal : mort en 8 heures.

La fixation du venin peut donc se faire à l'aide de lipides extraits de la moelle de porc alors que cette moelle entière ne fixe pas le poison. L'interprétation de ces résultats est très difficile. On pourrait tout d'abord admettre que par l'extraction et

par la dessiccation les lipoides ont perdu leur spécificité et sont devenus des composés chimiques sans individualité physiologique. Peut-être également, les lipoides spécifiques qui donnent ses caractères à la moelle de porc n'ont-ils pas été dissous par les solvants que nous avons employés. Quoiqu'il en soit, nous croyons avoir démontré la fixation du venin et sa neutralisation par le tissu nerveux et ses composants lipidiques.

V. FIXATION DE LA SPARTÉINE

Le sulfate de spartéine injecté à dose toxique au cobaye produit des accidents qui se succèdent dans un ordre et dans un temps rigoureusement précis. L'injection intra péritonéale d'une dose de 8 milligr. par 100 gr. d'animal amène au bout de 15 minutes une parésie puis la paralysie du train antérieur. Après 30 minutes apparaît la parésie du train postérieur en même temps qu'une dyspnée due à l'atteinte du diaphragme. L'animal meurt en 45 minutes par asphyxie due à la paralysie des muscles respiratoires. Ce tableau rappelle bien l'action du curare ainsi que le fait remarquer G. Billard, et la spartéine apparaît comme un poison neurotoxique à action rapide. La marche de l'intoxication établit déjà la réalité d'une affinité de la substance pour les centres nerveux, médullaires surtout. Nous avons réalisé cette fixation *in vitro* par un procédé semblable à celui que nous avons employé pour le venin de vipère.

A/ Fixation sur le tissu nerveux.

Nous avons mis la spartéine en présence de tissu nerveux d'animaux d'espèces différentes : cobaye, porc, veau, pour étudier la neutralisation du poison injecté à l'animal et préciser les conditions de cette neutralisation.

Cobaye n° 3 ♂ 440 gr. Un système nerveux central entier de cobaye est broyé et mis en contact avec une solution de spartéine. Après 1 heure de contact à la température du laboratoire, on injecte dans le péritoine de l'animal une quantité de solution correspondant à 8 milligr. de sulfate de spartéine par 100 gr. d'animal : survie sans accidents.

Cobaye n° 5 ♂ 250 gr. Un liquide contenant en suspension 7 gr. de moelle de porc broyée, filtrée, puis centrifugée est mis

en contact avec une solution de spartéine. Après 1 h. de contact à la température du laboratoire, on injecte dans le péritoine 8 mmg. (par 100 gr.) de spartéine.

Au bout de 15 minutes, parésie du train antérieur qui se dissipe après 45 minutes. Une heure après l'injection le cobaye est rétabli et il survit.

Cobaye n° 6 ♂ 245 gr. — 10 gr. de cerveau de veau sont broyés dans du sérum physiologique. Le liquide centrifugé qui contient en suspension la pulpe cérébrale, est mis en contact avec une solution de spartéine. Après 6 h. de contact à la température ordinaire, on injecte la même dose que pour 3 et 5, intrapéritonéale : survie sans accidents.

Il nous est apparu que la neutralisation nécessitait une certaine masse de tissu nerveux. Pour simplifier les procès-verbaux d'expériences que nous allons relater, nous dirons que le tissu nerveux était broyé dans le sérum physiologique et que ce liquide était ensuite filtré sur papier, mais non centrifugé.

Cobaye n° 13 ♂ 240 gr. — 4 gr. de moelle de porc sont mis en contact avec 0 gr. 04 de sulfate de spartéine pendant 16 h. à la température du laboratoire. On injecte une quantité de ce mélange correspondant à 9 milligr. de spartéine par 100 gr. Injection intrapéritonéale : mort en 1 h. 20.

Cobaye n° 14 ♂ 270 gr. — 6 gr. de moelle de porc sont en contact avec 0 gr. 04 de sulfate de spartéine pendant 22 h. à la température du laboratoire. On injecte une quantité correspondant à 10 milligr. de spartéine par 100 gr. Injection intrapéritonéale : mort en 50 minutes.

Cobaye n° 15 ♂ 320 gr. — 8 gr. de moelle de porc sont en contact avec 0 gr. 04 de sulfate de spartéine pendant 22 h. à la température du laboratoire. On injecte une quantité du mélange correspondant à 9 milligr. par 100 gr. Injection intrapéritonéale : survie sans accidents.

La rigueur à peu près mathématique avec laquelle l'animal meurt pour une dose de 8 mmg. pour 100 gr. et la constance avec laquelle il résiste à une dose de 6 mmg. pour 100 gr. nous permettent d'apprécier d'une façon assez précise la quantité de spartéine fixée par le tissu nerveux.

Le cobaye n° 13 meurt comme s'il avait reçu une dose mortelle un peu inférieure à celle qui tue en 45 minutes ; soit 7 mmg. 5. La différence entre la quantité active réelle et la quantité théo-

rique est donc de 9-7,5 soit 1 mmg. 5. Cette quantité est valable pour 100 gr. d'animal, mais ayant mis en présence la quantité nécessaire pour 450 gr. d'animal, il est facile de voir que les 4 gr. de moelle de porc ont fixé 6 mmg. 6 de sulfate de spartéine.

Le cobaye n° 14 meurt comme ayant reçu 8 mmg. alors que la dose théorique qu'il a reçue était de 10 mmg. par 100 gr. On a donc neutralisé 2 mmg. par 100 gr. d'animal. Les 6 gr. de moelle ont donc fixé 8 mmg. de toxique.

Enfin, le cobaye n° 15 qui survit a donc reçu une dose inférieure à 6 mmg. pour 100 gr. La neutralisation a donc été dans ce cas de 9-6 soit 3 mmg. pour 100 gr. Les 8 gr. de moelle ont fixé 13 mmg. de spartéine.

Les chiffres de 6,6, 8 et 13 mmg. sont (dans la marge d'erreur des phénomènes physiologiques) proportionnels aux poids de matière employée : 4,6 et 8 gr.

B / Fixation de la spartéine sur les lipides nerveux.

Nous avons essayé de préciser quel était, dans les constituants du tissu nerveux celui, ou mieux, le groupe de ceux qui fixent électivement la spartéine. Nous avons fait des extraits de lipides selon la technique exposée à propos du venin, et nous avons mis en contact ces solutions avec le poison.

Cobaye n° 747. 1/10 de cc. de lipides acéto-soluble de moelle de porc par 100 gr. d'animal est mélangé *in vitro* avec 9 millig. de sulfate de spartéine par 100 gr. d'animal. Après 15 minutes de contact à la température ordinaire, le mélange est injecté dans le péritoine de l'animal : survie sans accidents.

Cobaye n° 748. 1/10 de cc. (pour 100 gr.) de lipide alcool-soluble de moelle de porc + 9 mmg. de spartéine (pour 100 gr.). Contact 15 minutes. Injection intrapéritonéale : mort en une heure.

Cobaye n° 749. 1/10 cc. (pour 100 gr.) de lipides éthéro-solubles de moelle de porc + 9 mmg. de spartéine (pour 100 gr.). Contact 15 minutes. Injection intrapéritonéale : survie sans accidents.

Cobaye n° 750. 1/10 cc. (pour 100 gr.) de lipides acéto-solubles de moelle de veau + 9 mmg. de spartéine (pour 100 gr.). Contact 15 minutes. Injection intrapéritonéale : au bout de 20 minutes,

l'animal présente une parésie légère du train antérieur dissipée à la 40^e minute. Il est complètement rétabli au bout d'une heure et survit.

Cobaye n° 751. 1/10 cc. (pour 100 gr.) de lipides alcoolo-solubles de moelle de veau + 9 mmg. de spartéine (pour 100 gr.). Contact 15 minutes. Injection intrapéritonéale : survie sans accidents.

Cobaye 752. 1/10 cc. (pour 100 gr.) de lipides de moelle de veau + 9 mmg. de spartéine (pour 100 gr.). Contact 15 minutes. Injection intrapéritonéale : à la 20^e minute l'animal est pris de parésie du train antérieur. Les troubles augmentent, et à la 40^e minute l'animal est couché sur le flanc. Il se remet cependant peu à peu et après 1 h. 15 minutes il est complètement rétabli.

Ces expériences que nous avons renouvelées un grand nombre de fois, indiquent, sans aucun doute possible, la réalité de la fixation du sulfate de spartéine sur les lipides. Cette fixation est très énergique, à en juger par l'action considérable d'une très faible quantité de ces lipides mises en présence du poison. En effet, connaissant la quantité de moelle employée pour nos extractions, et la quantité totale de solution colloïdale de lipides obtenue, nous avons pu calculer que 1/10 de cc. de solution de lipides de moelle de veau correspond à 0 gr. 11 de moelle fraîche, et 1/10 cc. de solution de lipides de moelle de porc correspond à 0 gr. 067 de moelle fraîche. Ces chiffres doivent encore être considérés comme trop élevés car nous n'avons pas fait entrer en ligne de compte les pertes dues aux manipulations et aux défauts de l'extraction.

Nous sommes donc loin de 8 gr. de moelle qui étaient nécessaires pour la fixation sur l'organe frais, et nous sommes en droit de parler d'une affinité spéciale de la spartéine pour les lipides du tissu nerveux.

Ces composants semblent d'ailleurs se comporter d'une façon toute physico-chimique ou chimique dans cette neutralisation : nous en trouvons la preuve dans les expériences suivantes.

Nous avons pu chauffer à 70° et 100° ces solutions de lipides sans leur faire perdre leur pouvoir fixateur.

Cobaye n° 778 ♂ 570 gr. (*Témoin*). Lipides éthéro-solubles de moelle de porc + 9 mmg. de spartéine. Même technique que pour 749 : survie sans accidents.

Cobaye n° 779 ♀ 520 gr. — 1/10 cc (pour 100gr.) de lipides éthéro-solubles de moelle de porc chauffés à 100° pendant 15 minutes + 9 mmg. de spartéine. Injection intrapéritonéale après 15 minutes de contact : survie sans accidents.

Cobaye n° 785 ♂ 310 gr. — 1/10 cc. (pour 100 gr.) de lipides éthéro-solubles de moelle de porc, chauffés à 70° pendant 30 minutes + 9 mmg (pour 100 gr.) de spartéine. Injection intrapéritonéale après 15 minutes de contact : survie sans accidents.

Il ne s'agit donc pas d'une propriété physiologique proprement dite puisque des corps traités par des solvants peu compatibles avec la vie et chauffés, par surcroît, conservent toutes les propriétés dont jouit le tissu avec son intégrité anatomique et chimique. Ce caractère s'accorde parfaitement avec la théorie de la phylaxie que nous soutenons ; cette théorie ramène, en définitive, les antagonismes observés à des modifications physico-chimiques des éléments nerveux, conditionnant leur imperméabilité vis-à-vis de certains toxiques.

C/ Dérivation du pouvoir phylactique de la spartéine.

L'injection de spartéine à des doses voisines de la dose mortelle, préserve le cobaye contre une injection mortelle de venin faite plusieurs minutes, plusieurs heures, ou même plusieurs jours après.

Mais la neutralisation de la spartéine par les lipides fait perdre son pouvoir phylactique à cette substance. Il y a cependant des degrés dans cette absence de phylaxie. Nous avons injecté aux cobayes 747, 749, 750, 751, 752 huit jours après la spartéine mélangée aux lipides, une dose 4 fois mortelle de venin de vipère. Le témoin est mort en 4 h. ; 747 a survécu 4 h. ; 749, 3 h. 45 ; 750, 3 h. 55 ; 751, 3 h. 40 ; 752, 7 h. Un second témoin injecté à la spartéine huit jours auparavant a survécu à la même dose de venin.

La spartéine neutralisée n'a pas phylactisé l'animal. Seul, 752 qui a présenté des accidents spartéiniques graves a été légèrement protégé.

Ce nouveau phénomène n'était pas inattendu : la fixation de la spartéine sur les lipides ajoutés artificiellement se fait au détriment des lipides constituants du tissu nerveux de l'animal qui ne sont pas teints par le toxique aussi complètement que

d'habitude. L'animal n'est pas atteint par le poison, mais, en revanche, la « teinture » de son système nerveux n'est pas suffisante pour empêcher la fixation d'une seconde neurotoxine ; il n'est pas phylactisé. Un animal qui a reçu une quantité plus forte de spartéine libre (cobaye 752) a eu son système nerveux teint plus abondamment et aussi plus efficacement puisque, d'une part, il a eu des symptômes d'intoxication par la spartéine lors de la première injection, et, d'autre part, il a été légèrement phylactisé vis-à-vis du venin (par comparaison avec les autres cobayes).

De toutes les expériences que nous venons de rapporter, il ressort nettement que le sulfate de spartéine se fixe sur le tissu nerveux, et plus spécialement les lipides constituant de ce tissu. Nous pensons avoir montré également que les actions toxiques et phylactiques de la spartéine sont neutralisées par les lipides.



CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE

REPRODUCTION *in vitro* DE LA PHYLAXIE

Arrivés au terme de ces séries d'expériences que pouvons-nous conclure ? Personne ne nous contestera le droit d'envisager comme démontrée la réalité d'une affinité des neurotoxiques et de quelques phylactiques vis-à-vis de la substance nerveuse. Nous avons mis en évidence, également, que les lipides extraits de tissus nerveux fixent parfaitement les substances étudiées. La fixation du formol, seule, n'a pu être obtenue ; mais l'intoxication par cette substance révèle bien une imprégnation prépondérante du système nerveux. Nos observations donnent une base expérimentale à la conception de la phylaxie de Billard et permettent de la considérer comme une hypothèse moins audacieuse. Si le mode intime de l'adsorption des toxiques et phylactiques au système nerveux n'est pas encore connu, nous pensons avoir franchi une première étape en démontrant directement la teinture des lipides nerveux par ces substances.

D'ailleurs au cours de nos recherches sur la fixation nous avons pu, en collaboration avec M. G. Billard, réaliser *in vitro* sur du tissu nerveux ou des lipides, des expériences donnant l'image du phénomène qui a lieu *in vitro*.

La moelle de veau fixe et neutralise la spartéine et le venin de vipère. Mais un même fragment de moelle imprégné d'abord par la spartéine ne peut pas fixer ensuite le venin.

Cobaye n° 573 ♂ 260 gr. 10 gr. de moelle de veau grossièrement fragmentés sont mis en contact pendant 24 h. à la température du laboratoire, avec 0 gr. 10 de sulfate de spartéine en solution isotonique.

Ces fragments de moelle sont ensuite lavés 2 fois dans le sérum physiologique, puis mis en contact pendant 15 h. avec une solution de venin.

On injecte dans le péritoine du cobaye une quantité de ce liquide correspondant à 2/10 de mmg. de venin pour 100 gr. (dose 2 fois mortelle) : mort en 34 heures.

Cobaye n° 574 ♂ 260 gr. 10 gr. de moelle de veau sont mis en contact pendant 24 h. à la température du laboratoire avec 0 gr. 20 de sulfate de spartéine en solution isotonique. Les fragments de moelle sont ensuite lavés 2 fois dans le sérum physiologique (pour enlever l'excès de spartéine libre) puis mis en contact pendant 15 h. avec une solution de venin. On injecte dans le péritoine du cobaye une quantité de ce liquide correspondant à 2/10 de mmg. de venin pour 100 gr : mort en 14 heures.

Un cobaye témoin est mort avec cette dose de venin en 16 heures.

La moelle teinte par la spartéine ne peut donc plus recevoir le venin. N'est-ce point la phylaxie réalisée *in vitro* ? (le cobaye ayant seulement servi ici de réactif physiologique). Nous pouvons même apprécier quantitativement le phénomène : pour 573 les 10 centigr. de spartéine n'ont pas occupé tout le tissu nerveux ; une partie est restée libre pour fixer une fraction de la dose de venin, puisque l'animal ne meurt qu'en 34 h. Au contraire, 574 meurt dans le même temps que le témoin, car les 20 centigr. de spartéine ont occupé tout le tissu nerveux qui refuse ensuite d'admettre le venin.

Nous avons fait des observations semblables à l'aide des lipides.

L'eau minérale de Choussy neutralise l'action de la spartéine. Le poison est également fixé par les lipides éthéro-solubles de moelle de porc (p. 10 et p. 38).

Cobaye n° 750 ♂ 550 gr. Une solution de lipides éthéro-solubles de moelle de porc (1/10 cc. par 100 gr.) est mise en contact

pendant 40 minutes à la température ordinaire avec 2 cc. d'eau de Choussy. On ajoute ensuite de la spartéine à raison de 9 mmg. pour 100 gr. d'animal. Au bout de 5 minutes de contact le tout est injecté dans le péritoine de l'animal : mort en 30 minutes après avoir présenté tous les signes d'intoxication spartéinique.

L'eau de Choussy n'a donc pas empêché l'action de la spartéine les lipides n'ont pas fixé le poison. Il est logique de conclure que l'eau de Choussy (ou mieux les ions actifs contenus dans cette eau) se sont fixés sur les lipides nerveux les rendant impropres à fixer la spartéine. C'est la seule explication possible de cette expérience. C'est aussi l'explication que donne Billard de l'action remarquable de cette eau, *in vivo*, contre la spartéine. Nous avons donc eu la chance de saisir, dans un tube à essai, la marche de deux exemples de phylaxie.

Une expérience de P. Sédaillan et G. Loiseleur (1) peut être également interprétée comme une reproduction de la phylaxie *in vitro*. Ces auteurs ont reporté sur le terrain colloïdal les expériences de Wassermann et Takaki sur la fixation de la toxine tétanique sur le tissu nerveux. Une solution colloïdale d'extrait de substance cérébrale floccule très rapidement, en présence de toxine tétanique, de curare et d'opium.

L'addition de formol empêche cette flocculation. Les auteurs ont pratiqué cette addition de formol pour délimiter les fonctions physico-chimiques de la micelle intéressées par les neurotoxines. Pour notre part, nous trouvons, en outre d'une interprétation très intéressante du mode intime d'action de la toxine tétanique et du formol, une démonstration schématique de phylaxie par le formol vis-à-vis de la toxine tétanique.

Tous les faits expérimentaux que nous venons de rapporter semblent bien prouver que la phylaxie se produit par le mécanisme prévu par Billard. Peut-être pourrait-on discuter le rôle unique des lipides dans ces phénomènes et faire une place aux constituants colloïdaux non lipidiques des éléments nerveux. L'imprégnation par le formol et par la toxine tétanique entrerait dans ces cas discutables.

(1) P. SÉDAILLAN et G. LOISELEUR. Sur certains phénomènes physico-chimiques liés à l'action de la toxine tétanique et d'autres poisons du système nerveux. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, CXV, 479.

Quoiqu'il en soit, les phénomènes de phylaxie se ramènent à des modifications de perméabilité cellulaire. Les phylactiques empêchent la pénétration des toxiques jusque dans la partie vitale du protoplasme, par le seul fait qu'ils ont une même affinité pour les mêmes constituants : les premiers ont occupé la place s'opposant au passage des seconds.



DEUXIÈME PARTIE



La Phylaxie cellulaire

Il apparaît donc que, très vraisemblablement, les neurotoxines et les substances phylactiques qui leur sont opposées se fixent sur les lipides cellulaires. Cette démonstration — expérimentale pour un grand nombre de ces substances — apporte, nous le répétons, une confirmation très importante à la théorie de Billard. Nous avons pensé faire une contre-épreuve de cette théorie par une voie un peu indirecte. « Supposons le problème résolu » et admise la fixation des phylactiques sur les lipides, empêchant l'imprégnation de ceux-ci par les toxiques ; nous pouvons trouver en dehors du système nerveux des éléments attaqués par des poisons se fixant sur la partie lipidique de ces éléments. Pourra-t-on les préserver par l'action préalable d'une autre substance se fixant elle aussi sur ces lipides et jouant le rôle de phylactique. L'hémolyse provoquée par certains agents chimiques est due à la propriété de ces agents de se dissoudre dans les lipides globulaires. Ces substances hémolysantes sont donc comparables, dans leur mode d'action, aux neurotoxines. Est-il possible de protéger les globules par des substances elles aussi solubles dans les lipides, qui les « teindront », les modifieront, de façon à empêcher la fixation ultérieure des substances hémolytiques ? Si cette protection est possible ce sera une véritable « Phylaxie cellulaire » s'opérant par l'intermédiaire des lipoides. Nous pensons montrer que cette phylaxie cellulaire est possible et l'analyser dans ses détails. La connaissance du mode intime de ces actions protectrices nous apportera encore une preuve du bien-fondé de la théorie lipidique de la phylaxie, exposée par Billard.

Nous avons choisi le globule rouge parce que c'est un élément d'un maniement commode, chez lequel une altération même

légère est décelable par une issue d'hémoglobine facilement appréciable.

Pour l'étude de quelques cas d'hémolyse que nous allons faire, la conception anatomique du globule rouge est importante à préciser. Conformément aux données histochimiques classiques à l'heure actuelle, nous concevons le globule comme un composé homogène lipoprotéique auquel est fixée l'hémoglobine sans doute par adsorption. Nous considérons cependant comme très importante, une enveloppe lipoidique du globule rouge formée par précipitation physico-chimique. Cette enveloppe a un rôle protecteur très net vis-à-vis des globules ; n'a-t-on pas signalé que les hématies sénescents qui seront détruites dans la rate perdent au préalable leur enveloppe lipoidique.

Pour ce qui est du mécanisme de l'hémolyse, un grand nombre d'auteurs pensent que certaines substances hémolysantes agissent par suite de leur dissolution dans les composants lipidiques du globule. Le mécanisme de cette hémolyse se comprend assez bien d'après la conception actuelle de la structure du globule. Un premier stade est constitué par la dissolution dans l'enveloppe périphérique, temps qui au point de vue de l'issue de l'hémoglobine est nécessaire mais non suffisant. Des globules rouges ont pu, en effet, être sectionnés, cette membrane être donc altérée, sans qu'il y ait eu issue du pigment. Un second stade consisterait dans l'arrivée du toxique jusqu'aux lipides du complexe lipo-protéique. La modification des lipides (dissolution ou précipitation) par cet élément étranger rompt l'équilibre physico-chimique sur lequel était basée l'adsorption de l'hémoglobine : celle-ci est libérée et s'échappe du globule.

On comprend ainsi que l'hémolyse n'est pas en relation directe avec la mort du globule. L'hémolyse peut aussi n'être que partielle, directement en rapport avec la quantité de la substance globulaire imprégnée par l'agent hémolytique.

Le degré d'hémolyse pourra donc être un test fidèle de l'intensité de fixation des substances globulicides sur les lipides de l'hématie.

Ces points étant précisés, notre plan de travail, pour cette question, sera le suivant : Tout d'abord observer des phénomènes d'hémolyse avec certains agents chimiques hémolysants avec ou sans préparation des globules par des substances empêchant l'hémolyse ; ensuite essayer de démontrer que les substances hémolytiques et protectrices se fixent sur les constituants lipidiques de l'hématie.

I. DONNÉES EXPÉRIMENTALES RELATIVES A DES ACTIONS
PROTECTRICES VIS-A-VIS D'AGENTS
HÉMOLYTIQUES

Technique. — Nous avons le plus souvent employé des globules rouges de mouton adulte femelle, recueillis à différentes époques de l'année. Cette question de l'époque de l'année à laquelle le sang a été fourni n'est pas sans intérêt, sans pouvoir préciser les faits par des valeurs numériques, il nous a paru que les globules étaient plus sensibles aux agents hémolysants à la fin de l'hiver, après une longue stabulation des animaux ; néanmoins, pour les phénomènes de protection qui nous intéressent la marche générale est la même en été et à la fin de l'hiver.

Le sang est défibriné par agitation avec des perles de verre, centrifugé ; puis les globules sont lavés 4 fois dans une solution de chlorure de sodium à 9 pour mille.

Un centimètre cube de la purée globulaire est mis dans 7 centimètres cubes d'eau physiologique à 9 p. 1000. C'est de cette émulsion, à 1 p. 8, que nous nous sommes toujours servi dans nos expériences.

L'hémolyse était observée dans un volume total de 2 cc. de liquide isotonique contenant 0,2 d'émulsion globulaire. La température était celle du laboratoire, variant entre 14° et 18°, indiquée d'ailleurs pour chacun des comptes-rendus d'expérience que nous donnerons.

La marche de l'hémolyse était appréciée à des intervalles réguliers de temps par centrifugation et comparaison de la coloration du liquide avec une échelle analogue à celle de Vernes, allant de 0 — hémolysé nulle — à 8 hémolyse totale. Nous écrivons ces résultats : H0 et H8.

En dehors des hématies de mouton qui nous ont servi le plus souvent de matériel d'expérience, nous avons également étudié l'hémolyse et les actions protectrices à l'aide de globules rouges de cheval, de cobaye, de rat et de poule.

Ces globules étaient traités comme ceux de mouton, mis en suspension au 1/8 dans l'eau physiologique et employés à la dose de 0,2 dans 2 cc. de liquide.

Suivant la technique que nous venons d'exposer, nous avons étudié l'hémolyse par certaines substances : bromhydrate de

quinine, sulfate de spartéine, oléate de soude, dont l'action est entravée, quelquefois supprimée, par action préalable sur les globules, d'autres substances que nous pouvons considérer comme ayant une action protectrice. Le formol, l'oléate, le stéarate, le palmitate de soude (à certaines concentrations) le salicylate de soude ; le pyramidon, ont une action protectrice des plus nettes.

Ce sont ces actions que nous allons exposer dans leurs détails expérimentaux.

A/ *Action protectrice de l'aldéhyde formique vis-à-vis de l'hémolyse par le bromhydrate de quinine.*

L'action du formol sur les hématies a été étudiée par quelques auteurs. A la suite des travaux de Stewart (1) qui avait remarqué une action favorable du formol à faibles concentrations, protégeant le globule contre l'action de l'eau pure, d'abord, de la chaleur ensuite, P. Armand-Delille et Launoy (2) ont étudié l'influence de dilutions très étendues de formol sur la conservation des globules rouges et la persistance de leurs propriétés physiologiques. Dans une solution à 2 p. 1000 de solution commerciale de formol les hématies de mouton conservent pendant plus d'une semaine, à la température ordinaire, la même sensibilité que des globules neufs vis-à-vis des sérums hémolytiques, de telle sorte qu'ils peuvent parfaitement servir à l'étude de la déviation du complément et de la réaction de Wassermann.

En 1912, parut un mémoire important de P. Eisenberg (3) traitant un grand nombre de points de l'action du formol sur les hématies. En milieu isotonique, la concentration de 4 % en formaldéhyde est hémolytique. A des concentrations plus faibles, ce même agent se montre au contraire antihémolytique vis-à-vis de certaines substances. En présence de formol l'hémolyse par l'alcool, le phénol, la saponine, l'urée est augmentée. Les actions hémolytiques de l'acétone, de la soude, de l'ammoniaque,

(1) STEWART. The mechanism of haemolysis. *The Journ. of Pharmacol. and Exp. Therap.* 1909, (1), 51.

(2) P. ARMAND-DELILLE et LAUNOY. Etude de la stabilisation des globules rouges de mammifères par les solutions très diluées de formol. *Ann. I. P.*, 1911, XXV, 222.

(3) EISENBERG. Ueber die Formaldéhydehemolyse *Bioch. Zeitsch.* 1912, XLV, 305.

du cyanure de potassium, sont empêchées par la présence du formol en moyenne ou faible concentration. Eisenberg apporte un nombre considérable de faits, mais ne semble pas en tirer de conclusion générale précise ; il déclare d'ailleurs (p. 326), que le mécanisme de ces actions complexes d'agents hémolytiques est difficile à saisir ainsi que celui de l'hémolyse par le formol.

Au point de vue technique, les conditions dans lesquelles nous nous sommes placé sont très voisines de celles d'Eisenberg : il met le plus souvent en présence, 0, cc. 1 de suspension d'hématies à 13,2 % pour un volume total de 1cc. Mais une différence capitale, sur laquelle nous insistons dès maintenant, c'est qu'il a mis en présence, en même temps, formol et substances hémolytiques. C'est là un procédé très différent de celui que nous avons employé. On verra, en effet, que nous traitons d'abord les globules par le formol et c'est seulement après éloignement de tout formol libre que nous faisons agir les substances hémolytiques. Il est vrai que Eisenberg a fait quelques expériences dans les mêmes conditions que nous, mais il y enregistre des résultats identiques à ceux obtenus avec sa technique ordinaire des mélanges. Nous croyons avoir trouvé la raison de ces résultats dans le fait que l'auteur laisse les globules en contact avec le formol pendant une heure seulement à la température du laboratoire. Nous montrerons que le temps de contact nécessaire pour l'établissement de la protection est de 24 heures.

Nous avons tout d'abord étudié le rôle empêchant du formol vis-à-vis de l'hémolyse par le bromhydrate de quinine. Cette substance, en solution à 0 gr 50 pour cent dans le sérum physiologique, produit l'hémolyse des globules rouges de mouton. Avec les dilutions de globules lavés que nous employons, mises en contact avec 2 cc. de sérum quininé à 0 gr. 50% l'hémolyse apparaît au bout de 1 heure, à la température du laboratoire, et est complète au bout de 12 heures.

Avant de soumettre les globules lavés (seuls ou en présence de sérum sanguin) à l'action de la quinine nous les avons laissés en contact avec des solutions faibles d'aldéhyde formique. Après contact avec le formol, nous centrifugeons les globules, nous les lavons une fois dans l'eau distillée puis ils sont mis en présence du sérum quininé.

Le formol employé était une solution commerciale de Lam-

biotte qui, par suite de polymérisations, ne titrait plus que 29% en poids de formaldéhyde. Cette solution était diluée dans 4 fois son volume d'eau physiologique à 9 p. 1000 et ajoutée goutte à goutte dans l'eau des tubes à hémolyse.

L'hémolyse ne se produit plus à partir d'une certaine concentration en formol et après un contact suffisant. Nous avons fait varier l'un et l'autre de ces facteurs, nous avons également étudié l'action protectrice du formol en présence de sérum sanguin. Les tableaux suivants résument nos recherches sur ce point :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G.R. Mouton 0 ^{cc} ,2														
Sérum sanguin	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1
Conc. en formol %	0	0	0,27	0,27	0,65	0,65	1,2	1,2	1,38	1,38	1,68	1,68	2,05	2,05
Ap. 24 h. de cont.	H0	H0	H0	H0	H1	H0	H1	H0	H1	H0	H8	H0	H8	H0
Lavage des glob. Mise en présence de quinine														
Hémol. ap. 7 h.	H4	H3	H3	H4	H5	H4	H3	H1	H2	H?		H0		H0
Hémol. après 24 h.	H8	H8	H8	H8	H8	H8	H8	H4	H1	H1?		H0		H0

TABLEAU I. — Température 15°

A noter, qu'à partir des concentrations en formol de 1,2% sans sérum et de 1,68% avec sérum, le pigment sanguin est transformé en méthémoglobine après un contact de quelques heures. Pour une concentration de 1,68%, sans sérum, il y a altération grave des globules qui sont agglutinés et très rapidement hémolysés.

Le sérum sanguin semble préserver le globule contre l'action du formol et aussi lui apporter une substance qui, unie à la formaldéhyde, empêche mieux l'action hémolytique de la quinine. En effet, une action protectrice se montre déjà avec une concentration de 1,2% (tube 8) en présence de sérum, alors qu'à

la même concentration (tube 7) les globules lavés ne sont que très peu préservés.

A quoi attribuer cette influence du sérum ? L'hémolyse par la quinine n'est pas influencée par le contact préalable des globules avec le sérum ; entre les tubes témoins 1 et 2 les différences sont très peu marquées. C'est donc dans la phase d'action du formol sur les globules que se passe un phénomène particulier. Tout porte à croire que le formol fixe sur les globules une substance protectrice contenue dans le sérum. C'est un point sur lequel nous reviendrons à la fin de cette partie de notre étude.

Il nous reste à préciser le temps de contact nécessaire des hématies avec le formol pour obtenir la meilleure préservation.

G. R. Mouton 0 ^{cc} ,2 Sérum sanguin 0,1								
Conc. en formol %	1, 68	1, 68	1, 68	1, 68	1, 68	1, 68	1, 68	1, 68
Temps de contact	5'	15'	30'	1 h.	3 h.	6 h.	8 h.	24 h.
Lavage des hématies Mise en présence de quinine								
Hémolyse après 6 h.	H7	H6	H5	H7	H2			H0
Hémolyse après 24 h.	H8	H8	H8	H8	H8	H8	H8	H0

TABLEAU II. — *Température 15°*

✓ Un contact de plus de 8 heures et, au mieux, de 24 heures est donc nécessaire pour préserver le globule.

Nous avons ensuite étudié l'influence du formol mis en présence des globules rouges au même moment que la quinine. Dans ces conditions l'hémolyse est non plus entravée, mais au contraire accélérée.

Le sérum quininé à 0,50% qui en 7 heures, dans nos conditions expérimentales ordinaires, donne H4, additionné de formol en concentration de 0,27% donne, dans le même temps, H7. Le défaut de protection dans ce cas pouvait se prévoir d'après la

nécessité du temps prolongé de contact avec l'aldéhyde formique que nous venons de signaler ; mais il n'y a pas seulement manque de préservation, il y a aggravation de la sensibilité à l'agent hémolytique. Nous voyons ainsi la même substance devenir agent de protection ou d'aggravation suivant le moment de l'application. C'est un point important pour l'identité des phénomènes observés sur les globules, avec la Phylaxie de Billard.

B/ *Action protectrice de l'aldéhyde formique vis-à-vis de l'hémolyse par le sulfate de spartéine.*

Le sulfate de spartéine est un hémolytique puissant ainsi que nous l'avons montré récemment (1).

0 cc. 2 de solution à 1 p. 8 de globules, lavés 4 fois sont mis dans un volume total de 2 cc. 5 de sérum physiologique additionné de spartéine. Le tableau III résume les résultats.

	1	2	3	4
G. R. Mouton 0 ^{cc} .2				
Concentration en spartéine p. 100	0,016	0,032	0,048	0,064
Hémolyse après 15'	H0	H1?	H1	H6
Hémolyse près 30'	H0	H1	H4	H7
Hémolyse après 1 heure	H1	H2	H4	H7
Hémolyse après 10 heures	H1	H4	H8	H8

TABLEAU III.

L'expérience s'est poursuivie à la température du laboratoire : 16°. Les hématies de plusieurs mammifères sont hémolysées également par le sulfate de spartéine mais présentent des résistances très inégales ; c'est ainsi que les hématies de cheval et de lapin se sont montrées plus résistantes que celles du mouton.

Cette action hémolytique est retardée ou suspendue par le

(1) P. DODEL. Hémolyse *in vitro* par le sulfate de spartéine. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, CXIX, 578.

contact préalable avec des concentrations faibles de formol. Le tableau IV montre la netteté de ces actions protectrices.

	1	2	3
G. R. Mouton 0 ^{cc} ,2			
Concentration en formaldéhyde pour 100	0	1,2	1,68
Hémolyse après 24 heures de contact	H0	H0	H0
Lavage des globules Addition de Spartéine aux concentrat. %	0,05	0,05	0,05
Hémolyse après 15'	H6	H1 ?	H0
Hémolyse après 30'	H7	H1 ?	H0
Hémolyse après 1 heure	H7	H1 ?	H0

TABLEAU IV

C/ *Action protectrice de l'aldéhyde formique vis-à-vis de l'hémolyse par l'oléate de soude.*

L'action hémolytique puissante de l'oléate de soude sur les globules rouges de mouton lavés, est entravée par l'action du formol, ainsi que le résume notre tableau V.

	1	2	3	4
G. R. Mouton 0 ^{cc} ,2				
Concent. en formaldéhyde p. 100	0	0	0,27	0,65
Hémol. après 24 h. de contact	Ho	H0	H0	H0
Lavage des globules Addition d'oléate de soude aux concentrations p. 100	0,0025	Formol Oléate	0,0025	0,0025
Hémolyse après 30'	H5	H0	H0	H0
Hémolyse après 6 h.	H6	H6	H0	H0
Hémolyse après 24 h.	H8	H8	H0	H0

TABLEAU V

En 2 nous avons fait agir le mélange : formol à 0,27% et oléate à 0,0025%. Le résultat a été un retard dans l'apparition de l'hémolyse mais non pas une protection véritable puisqu'au bout de 6 heures l'hémolyse est au même point dans les tubes 1 et 2. Au contraire, l'action préservatrice du formol a donné une résistance absolue aux hématies vis-à-vis de l'oléate de soude.

D/ *Action protectrice de l'oléate de soude vis-à-vis de l'hémolyse par le sulfate de spartéine.*

A des concentrations très faibles l'oléate de soude n'a pas d'action hémolytique ; nous lui avons trouvé au contraire une certaine action protectrice vis-à-vis de la spartéine. Le tableau VI montre cette action, à la vérité assez peu marquée, mais cependant réelle. Elle se manifeste à peu près aussi bien après action préalable de l'oléate qu'avec le mélange oléate-spartéine (aux mêmes concentrations).

	1	2	3	4	5
Concentrat. en oléate %	0	0	0.00025	0,0005	0
Après 6 h. de contact	H0	H0	H0	H0	H0
Lavage des globules addition de spartéine (concentration) %	0	0,06	0,06	0,06	Oléate + Spart.
Hémolyse après 15'	H0	H4	H2	H2	H3
Hémolyse après 30'	H0	H6	H4	H4	H4

TABLEAU VI. — G. R. de Mouton 0^{cc},2
Température 14°

E/ *Action protectrice du stéarate et du palmitate de soude vis-à-vis de l'hémolyse par le sulfate de spartéine.*

Ce n'est pas seulement l'oléate, mais encore le stéarate et le palmitate de soude qui, à de faibles concentrations, ont le pouvoir d'entraver l'hémolyse par la spartéine. Cette action paraît plus marquée que celle de l'oléate. Le tableau VII montre une

expérience poursuivie avec les trois savons parallèlement. Le palmitate paraît le plus apte à préserver les globules rouges contre l'action hémolytique de la spartéine.

Concentration % en oléate	0	0,00025	0,0005	0,00075						
Concentration % en Stéarate	0				0,00025	0,0005	0,00075			
Concentration % en palmitate	0							0,00025	0,0005	0,00075
Lavage de globu. Addition de spart. à la concentr. % de	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Hémol. ap. 15'.	H3	H1	H1?	H0	H1	H1	H1	H1?	H0	H0
Hémol. ap. 1 h.	H4	H2	H1	H1	H2	H1	H1	H1?	H1?	H0

TABEAU VII. — G. R. de Mouton 0^{es},2. — Température 15°

F/ Action aggravante de l'oléate de soude par rapport à l'hémolyse par le bromhydrate de quinine.

Cette action protectrice des savons ne s'exerce pas vis-à-vis de tous les agents hémolytiques ; c'est ainsi que si l'oléate entrave l'action de la spartéine, il accélère au contraire celle du bromhydrate de quinine sur les globules rouges.

	1	2	3
Concentration en oléate %	0	0,0005	0,0010
Après 12 heures de contact	H0	H0	H0
Lavage des globules Addition de quinine à 0,50 %			
Hémolyse après 30'	Ho	H1	H2
Hémolyse après 1 heure	H1 ?	H2	H6

TABEAU VIII. — G. R. de Mouton 0^{es},2. — Température 14°

G/ *Action protectrice du salicylate de soude vis-à-vis de l'hémolyse par le sulfate de spartéine.*

En solution isotonique à 1%, le salicylate de soude n'est pas hémolytique pour les globules du mouton. A cette concentration de salicylate, après un contact de quelque durée les globules rouges ont acquis une grande résistance à l'égard de la spartéine, ainsi qu'en témoignent les résultats condensés dans le tableau IX.

	1	2	3	4	5	6
Concentration en salicylate %	1	0	0	1	1	0
Après 12 heures de cont.	H0	H0	H0	H0	H0	H0
Lavage des globules Addition de Spartéine concentr. %	0	0,037	0,05	0,037	0,05	Salicyl. + Spart.
Hémolyse après 15'	H0	H1	H2	H0	H0	H0
Hémolyse après 30'	H0	H3	H3	H1?	H1?	H0
Hémolyse après 1 h.	H0	H4	H5	H1	H1	H1 ?

TABLEAU IX. — *Température 15°*

Nous voyons en 6 que l'action protectrice du salicylate de soude se manifeste également par le mélange *in vitro* des deux substances et que cette protection est même plus efficace que celle résultant de l'action préalable du salicylate sur les globules.

H/ *Action aggravante du salicylate de soude vis-à-vis de l'hémolyse par le bromhydrate de quinine.*

Il se passe avec le salicylate de soude un phénomène analogue à celui que nous avons observé avec l'oléate. L'hémolyse par la quinine au lieu d'être enrayée est accélérée par un traitement préalable des hématies par le salicylate.

Concentration en salicylate %	0	1	1
Après 12 heures de contact	H0	H0	Ho
Lavage des globules Addition de quinine 0.5 %			
Hémolyse après 30'	H0	H1	H1
Hémolyse après 1 heure	H1 ?	H4	H4

TABLEAU X. — Température 14°

J/ Action protectrice du pyramidon vis-à-vis de l'hémolyse par le sulfate de spartéine.

Le pyramidon ou phényl-diméthyl-amido-diméthyl-pyrrazolone, à la concentration de 1%, préserve les globules rouges de mouton contre la spartéine.

Concent. en pyram. %	1	0	0	1	1	0
Après 12 h. de contact	H0	H0	H0	H0	H0	
Lavage des globules Addition de Spartéine concentration %	0	0,037	0,05	0,037	0,05	Pyram. + Spart.
Hémolyse après 15'	H0	H1	H2	H0	H0	H0
Hémolyse après 30'	H0	H3	H3	H1 ?	H1 ?	H0
Hémolyse après 1 h.	H0	H4	H5	H1	H2	H1 ?

TABLEAU XI. — G. R. Mouton. — Température 14°

Cette action, comme celle du salicylate, se manifeste aussi bien par le mélange *in vitro* des deux substances que par leur action simultanée.

Contrairement au salicylate, le pyramidon n'a pas d'action vis-à-vis de l'hémolyse par le bromhydrate de quinine.

En résumé, il est possible, en faisant agir certaines substances sur les globules d'empêcher l'hémolyse par certains agents hémolytiques.

Les résultats de nos recherches peuvent se schématiser ainsi :

Par action préventive, le formol empêche l'hémolyse par la quinine

Par action préventive, le formol empêche l'hémolyse par la spartéine.

Par action préventive, le formol empêche l'hémolyse par l'oléate.

Par action préventive, l'oléate de Na empêche l'hémolyse par la spartéine.

Par action préventive, le stéarate de Na empêche l'hémolyse par la spartéine.

Par action préventive, le palmitate de Na empêche l'hémolyse par la spartéine.

Par action préventive, le salicylate de Na empêche l'hémolyse par la spartéine.

Par action préventive, le pyramidon empêche l'hémolyse par la spartéine.

Par action simultanée, le salicylate empêche l'hémolyse par la spartéine.

Par action simultanée, le pyramidon empêche l'hémolyse par la spartéine.

Par action simultanée, le formol accélère l'hémolyse par la quinine.

Par action simultanée, le salicylate accélère l'hémolyse par la quinine.

Par action simultanée, l'oléate accélère l'hémolyse par la quinine.

Devant ces résultats, on ne peut s'empêcher de penser aux phénomènes de phylaxie. C'est la même action antagoniste de deux substances, quelquefois toxiques toutes les deux. C'est aussi, dans certains cas, pour le formol par exemple, la même action protectrice s'il est porté avant le toxique, et la même action nocive et aggravante s'il est administré au même moment ou postérieurement.

Il y a plus, le seul examen de nos résultats obtenus sur les hématies permet d'affirmer que l'action phylactique des substances étudiées s'opère par l'intermédiaire d'une modification du globule lui-même. Il ne peut être question de neutralisation *in vitro* des poisons par les substances protectrices : l'action simultanée serait alors la plus phylactique, or c'est souvent l'inverse.

Bien plus vraisemblable nous paraît être l'hypothèse qui envisage une teinture préalable du globule par une substance,

en empêchant une seconde de se fixer. S'il est vrai que les agents hémolytiques agissent par l'intermédiaire des lipides, les deux substances semblent se fixer sur les mêmes composants du globule. Ne voyons-nous pas l'oléate, le stéarate et le palmitate de soude — tous trois des hémolytiques puissants — devenir des substances phylactiques si leurs concentrations sont suffisamment abaissées? (Et ceci nous rappelle la spartéine, neurotoxique qui, à dose non mortelle, est phylactique contre le venin de vipère). Comme hémolytiques ou phylactiques les affinités de ces corps sont les mêmes et d'après cet exemple il est possible d'avoir une idée du mécanisme intime de ces phénomènes.

L'identité de ces protections globulaires avec la phylaxie devient donc plus complète encore en embrassant, non seulement la forme extérieure des faits, mais encore la conception logique de leur mécanisme. Ne sommes-nous pas en droit de prononcer le mot de « *phylaxie cellulaire* » pour désigner l'ensemble de nos constatations concernant les globules rouges ?

De même que nous avons essayé de démontrer la réalité d'une fixation des substances neurotoxiques et phylactiques sur les lipides du névraxe, nous allons essayer de montrer que les substances hémolytiques et phylactiques du globule rouge ont une affinité élective pour les lipides globulaires ; c'est-à-dire que l'hémolyse et la protection entrent en jeu par l'intermédiaire de ces constituants cellulaires.

II. RÔLE DES LIPIDES DANS LE MÉCANISME DES ACTIONS HÉMOLYTIQUES ET PHYLACTIQUES

1^o *Recherches antérieures.*

Le rôle des lipides dans les phénomènes d'hémolyse a été établi pour quelques hémolytiques, aussi, avant d'exposer les preuves expérimentales que nous pouvons apporter à la question, nous devons en résumer brièvement l'histoire.

Pour quelques auteurs, les protéiques joueraient le rôle important dans la fixation des substances hémolytiques. Donati et Satta (1) ont démontré que quelques composés albuminoïdes

(1) DONATI et SATTA. Influence de quelques substances protéiques sur l'hémolyse déterminée par le glycocholate et l'oléate sodique. *Arch. it. biol.*, 1908, L.

(du sérum de bœuf notamment) avaient une action empêchante vis-à-vis de l'hémolyse par le glycocholate et l'oléate de soude. Pour V. Eisler (1) et V. Liebermann, la sérum-globuline et la sérum-albumine s'opposent à l'action hémolytique de la staphylolysine, de la tétanolysine, et du savon. Bayer (2) compare le pouvoir inhibiteur de la lécithine et celui des substances protéiques vis-à-vis de l'hémolyse par les acides biliaires et trouve ce pouvoir plus marqué avec les protéiques. Eric Ponder (3) qui a étudié d'une façon très systématique le pouvoir antihémolytique du sérum sanguin, admet l'action prépondérante des albumines dans la fixation des agents hémolytiques.

Dans deux très importants mémoires, E. Hédon a étudié l'action inhibitrice du sérum sanguin à l'égard de l'hémolyse par quelques glucosides (4). Il a démontré que cette action est due à la partie non dialysable du sérum sans qu'il puisse préciser si c'en est la partie albuminoïde ou un autre constituant.

Plus nombreux sont les auteurs qui ont rapporté des observations de fixation des hémolytiques sur les lipides.

Ransom, un des premiers, a signalé que le cholestérol inhibe l'hémolyse par la saponine et a rapporté l'effet inhibiteur du sérum sur cette substance. Meyer (5) confirme les expériences de Ransom et les complète par des comparaisons de sensibilité des globules rouges des différentes espèces, à la saponine. Cette sensibilité est directement proportionnelle à la richesse en lécithine et inversement proportionnelle à la teneur en cholestérine. L'auteur applique ces résultats à une théorie de l'hémolyse par dissolution de la lécithine du stroma des globules, dissolution qui serait entravée plus ou moins par la présence de la cholestérine.

Cernovodeanu et Vict. Henri (6) ont montré que l'action

(1) V. EISLER. *Zeitsch. für Exp. Pathol. und Therapie* 1906 (3).

(2) BAYER. *Bioch. Zeitsch.* 1907 (3).

(3) ERIC PONDER. Effet inhibiteur du sérum sanguin sur l'hémolyse. *Proc. of Roy. Soc. B* 1923-24, XCV.

(4) E. HÉDON. Sur l'hémolyse par les glucosides globulicides et les conditions de milieu qui la favorisent ou l'empêchent. *Arch. int. Pharmacol. et de Thérap.* 1901, VIII et IX.

(5) K. MEYER. Mécanisme de l'hémolyse par la saponine. *Beitr. Z. chem. Physiol. und Path.* 1908, XI.

(6) CERNOVODEANU et Vict. HENRI. Recherches sur la toxine et l'antitoxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1907, LXII, 392.

hémolytique de la toxine tétanique est empêchée par la cholestérine et d'autres substances grasses ; l'extrait éthéré de sérum antitétanique possède un pouvoir antitétanolytique très élevé.

H. Iscovesco (1) a signalé le rôle antihémolytique des lipoides du sang, notamment de la cholestérine.

Après injection d'émulsion d'huile d'olives au lapin, A. Frouin (2) a vu les globules du sujet être plus résistants à de nombreux agents hémolytiques : sérum humain, saponine, solanine, venin de cobra, toxine tétanique. Cette résistance plus grande est également conférée aux globules par le contact *in vitro* avec l'huile et lavage ultérieur.

Neuberg, enfin, a noté un parallélisme très marqué entre les phénomènes d'hémolyse et de lipolyse.

Les travaux de Mayer et Schaeffer par leur précision et leur ampleur ont, semble-t-il, apporté une solution à la question du mécanisme de certaines hémolyses. Par la comparaison de la résistance globulaire à différents hémolytiques de plusieurs espèces animales et par la comparaison de la teneur en acides gras et cholestérine des globules et du sérum sanguin, ces auteurs ont établi les faits suivants : (3)

« A / Hémolyse par les sérums hétérogènes.

1^o Nous avons indiqué que les globules des différentes espèces sont inégalement résistants aux sérums hétérogènes. L'ordre de résistance croissant est le suivant : cobaye, lapin, cheval, mouton, bœuf, porc, chien, poule.

Nous disions qu'il devait se trouver dans les globules un élément, un paramètre, variant quantitativement dans le même ordre. Nous trouvons au moins un facteur de ce paramètre dans ce tableau. Ce sont les acides gras et non volatils.

2^o D'autre part, les différents sérums normaux sont inégalement hémolytiques. L'ordre de puissance croissante est le suivant : cobaye, lapin, cheval, mouton, bœuf, porc, chien ; puis, avec des différences : poule, murène, anguille.

(1) H. ISCOVESCO. Les lipoides du sang, leur pouvoir antihémolytique. *C. R. Soc. Biol.*, 1908, LXIV.

(2) A. FROUIN. Action antihémolytique des émulsions d'huile. *C. R. Soc. Biol.*, 1908, LXIV.

(3) MAYER et SCHAEFFER. Composition chimique du sang et hémolyse. *C. R. Ac. Sc.*, 1912, CLV, 731.

Il se trouve dans la composition au moins un élément variant dans le même ordre, c'est la cholestérine ; c'est donc un des facteurs du paramètre prévu.

B/ Hémolyse par les agents hémolytiques.

Comme nous l'avons dit, l'ordre de résistance globulaire varie avec l'agent hémolytique considéré. Par exemple, l'ordre de résistance croissante à l'oléate de soude et, sauf certaines modalités (paradoxe hémolytique de Moore) à d'autres agents encore (glucosides, etc.) est le suivant : lapin, chien, cobaye, cheval, bœuf, porc, mouton. Le paramètre dont dépend la résistance ne peut donc pas être le même dans le cas des sérums et dans celui de ces agents : dans ce dernier cas le paramètre dépend d'un facteur qui est proportionnel à la teneur en cholestérine.

On voit dès à présent que l'analyse montre bien les différences quantitatives que nous supposions exister entre les sérums et entre les globules des différentes espèces. L'établissement des paramètres que nous cherchions et qui, nous l'avons montré, jouent un rôle dans l'action des sérums hémolytiques naturels ou acquis sera donc possible. »

2° *Recherches expérimentales sur la fixation du sulfate de spartéine, du bromhydrate de quinine, de l'oléate de soude et du salycilate de soude par les lipides globulaires.*

Nous avons recherché d'une façon plus spéciale le pouvoir de fixation des lipoïdes pour les substances que nous avons reconnues hémolytiques et phylactiques pour les hématies. Notre technique générale a été la suivante : les substances sont employées à dose nettement hémolytique pour 0, cc. 2 de suspension globulaire au 1/8. L'agent hémolytique est tout d'abord mis en présence, pendant un temps variable, avec un volume déterminé de solution colloïdale de lipoïdes ; puis les lipoïdes sont introduits dans la solution et le degré d'hémolyse apprécié après centrifugation, par comparaison avec une échelle arbitraire de 0 à 8 (hémolyse totale).

Les lipides globulaires sont extraits par le même procédé que les lipides du tissu nerveux. Après lavage dans l'eau physiologique à 9 p. 1000, des globules rouges de mouton sont mis dans un volume double d'acétone pure. La masse de globules employés correspond à un volume de sang de 200 cc. Il convient d'agiter fortement le liquide pour éviter qu'au premier contact les hématies ne soient agglutinées. Les globules restent pendant

une semaine dans l'acétone ; débarrassés de cette substance par filtration sur papier et séchés dans le vide, ils sont mis ensuite pendant une autre semaine dans un volume double d'alcool méthylique à 99°, filtrés de nouveau et séchés puis, pendant une semaine encore laissés dans 2 fois leur volume d'éther sulfurique. Les liquidés ayant servi à ces macérations successives sont recueillis dans des récipients à fond plat et évaporés dans le vide. Après évaporation il reste dans chacun de ces récipients les constituants lipidiques enlevés aux globules. Les substances acéto-solubles se présentent sous l'aspect d'une graisse compacte et jaunâtre contenant sans doute la plus grande partie des graisses globulaires. Le résidu alcoolo-soluble est fortement coloré en brun par une fraction de méthémoglobine entraînée des globules. C'est une pâte assez dure contenant peu de graisses mais probablement un grand nombre des phosphatides du globule. La substance obtenue après évaporation de l'éther se présente sous la forme d'une croûte avec tendance à la cristallisation. Cette portion éthéro-soluble contient très peu de graisses, celles-ci ayant été retenues par l'acétone ; elle contient la plus grande partie de la cholestérine et des lipoides non phosphorés du globule.

Etant donné, d'une part, notre connaissance imparfaite de tous les lipoides, et d'autre part, la technique rapide que nous avons employée, l'énoncé que nous venons de faire des substances dissoutes dans nos extraits ne peut être considéré que comme approximatif.

Nos extraits lipidiques sont ensuite repris dans de l'eau salée à 9 pour 1.000, la dissolution s'opérant à chaud (40°-50°) et par agitation. Au bout de quelques heures ces solutions sont centrifugées de façon à enlever l'excès qui n'est pas en solution colloïdale. Nous obtenons ainsi des solutions saturées de lipides, acéto, alcoolo ou éthéro solubles.

A / Fixation de la spartéine sur les lipides globulaires.

0 cc, 5 de solution saturée des lipides globulaires sont mis avec 1 cc, 5 d'eau physiologique en présence d'une quantité de sulfate de spartéine suffisante pour hémolyser 0 cc, 2 de suspension globulaire.

Après 6 h. de contact des lipides avec la spartéine les globules rouges sont introduits dans la solution.

		Acéto Soluble	Alcoolo Soluble	Ethero Soluble
Eau physiologique	2 cc.	1,5	1,5	1,5
Lipides	0	0,5	0,5	0,5
Spartéine (concentration %)	0,05	0,05	0,05	0,05
Après 6 heures Addition de G. R. 0 cc. 2				
Hémolyse après 15'	H1	H0	H0	H0
Hémolyse après 1 heure	H4	H0	H0	H1 ?
Hémolyse après 2 heures	H6	H4	H1	H1

TABLEAU XII. — *Température 13°*

Tandis que dans le 1^{er} tube (témoin) après 2 h. l'hémolyse est de H6, elle n'est que de H1 dans les tubes contenant les lipoides alcoolo et éthéro solubles, et atteint H4 dans le tube des lipides acéto-solubles.

Il nous semble logique de conclure que la spartéine a été fixée presque en totalité par les lipoides alcoolo et éthéro solubles tandis que les lipides acéto solubles ne l'ont que très peu retenue.

Nous avons également recherché cette fixation de la spartéine par les lipoides globulaires dans l'injection au cobaye d'un mélange de sulfate de spartéine, à dose nettement mortelle et de lipoides alcoolo solubles de globules de mouton :

Cobaye n° 843 ♂ 330 gr. Une solution colloïdale de lipoides alcoolo solubles de globules rouges de mouton à raison de 0 cc, 1 pour 100 gr. d'animal est mise en contact pendant 5 minutes, à la température du laboratoire, avec une solution de sulfate de spartéine à la dose de 0 gr. 10 pour 100 gr. d'animal. Ce mélange est injecté dans le péritoine du cobaye. Celui-ci survit sans avoir présenté d'accidents spartéiniques.

Cette affinité de la spartéine pour certains lipoides globulaires nous paraît nettement démontrée ; ne peut-on pas admettre, en conséquence, que l'hémolyse spartéinique est due à une modification des lipides du stroma de l'hématie, cette modification entraînant un déséquilibre dans le complexe protéique-

lipoïde-hémoglobine avec libération de cette dernière substance ?

B/ *Fixation de l'oléate de soude sur les lipides globulaires.*

Même technique que pour la spartéine : l'oléate, à dose hémolytique, est mis en présence des lipides pendant 6 h.

		Acéto Soluble	Alcoolo Soluble	Ethero Soluble
Lipides	0	0 cc. 5	0,5	0,5
Eau physiologique	2	1,5	1,5	1,5
Oléate (concentration ‰)	0,005	0,005	0,005	0,005
Après 6 heures Addition de G. R. 0 cc. 2				
Hémolyse après 15'	H1 ?	H0	H0	H0
Hémolyse après 1 heure	H1	H0	H0	H0
Hémolyse après 2 heures	H3	H0	H0	H1
Hémolyse après 18 heures	H8	H1	H1	H8

TABLEAU XIII. — *Température 13°*

Dans ce cas ce sont les lipides acéto et alcoolo solubles qui ont le mieux fixé l'agent hémolytique. Les lipoïdes éthéro-solubles ont légèrement retardé l'hémolyse mais ne l'ont pas empêchée d'arriver au même stade que dans le tube témoin.

Une conclusion logique de ces résultats paraît être que l'oléate de soude est hémolytique par son action sur certains lipides globulaires ; à concentration phylactique il produit également une modification de ces mêmes lipides — le degré de cette modification étant simplement plus léger.

C/ *Fixation du bromhydrate de quinine sur les lipides globulaires.*

Comme pour les recherches précédentes, le sérum quininé à 0 gr. 50% est mis en contact pendant 6 h. avec les lipides.

		Acéto Soluble	Alcoolo Soluble	Ethero Soluble
Lipides	0	0 cc. 5	0,5	0,5
Eau physiologique	0,5	0	0	0
Sérum quininé 0,5 %	1,5	1,5	1,5	1,5
Après 6 heures Addition de G. R. 0 cc. 2				
Hémolyse après 1 heure	H0	H0	H0	H0
Hémolyse après 2 heures	H1	H0	H0	H0
Hémolyse après 18 heures	H7	H7	H2	H2

TABLEAU XIV. — *Température 13°*

Dans le tube contenant les lipides acéto solubles, ainsi que dans le tube témoin, l'hémolyse est de H7 après 18 h., tandis que pour les autres lipéoïdes étudiés elle n'est que de H2.

Comme pour la spartéine ce sont donc les alcoolo-éthéro solubles qui possèdent le pouvoir de retenir le bromhydrate de quinine.

Ne semble-t-il pas, dès lors, que nous pouvons interpréter l'hémolyse quininique comme une action portant sur les lipéoïdes des hématies ? René Fabre et Simonnet arrivent à une conclusion semblable par un mode d'étude tout différent (1).

D/ *Fixation du salicylate de soude sur les lipides globulaires.*

Dans ce cas nous avons dû compliquer un peu la technique ; le salicylate ne devenant hémolytique qu'à des concentrations trop hypertoniques, nous nous sommes servi du pouvoir phylactique du salicylate vis-à-vis de l'hémolyse spartéinique.

Le salicylate de soude est mis en contact avec les lipides pendant 6 h. ; puis les globules introduits dans la solution sont laissés en présence de ces solutions pendant 18 h. Ils sont

(1) R. FABRE et H. SIMONNET. Contribution à l'étude de l'hémolyse. *Ann. Physiol. et Phy.*, 1926. II (4), 390.

ensuite lavés et mis dans des solutions de spartéine fortement hémolytiques.

Les deux premiers tubes du tableau XV sont des tubes témoins l'un de l'action hémolytique du sulfate de spartéine, l'autre de l'action phylactique du salicylate contre cette hémolyse.

			Acéto Soluble	Alcool Soluble	Ethero Soluble
Lipides	0	0	0 cc. 5	0,5	0,5
Salicylate 1 % Eau physiol.	0 2 ^{cc}	1,5 0 ^{cc} 5	1,5 0	1,5 0	1,5 0
Ap. contact de 6 h. Addition G.R. 0 ^{cc} 2					
Hémol. après 18 h.	H0	H0	H0	H0	H0
Lavage des globules Addit. spartéine %	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Hémolyse après 15'	H3	H0	H1	H0	H0
Hémolyse après 30'	H5	H1 ?	H3	H1 ?	H1 ?

TABLEAU XV. — *Température 14°*

Seuls, les lipides acéto-solubles ayant empêché dans une certaine mesure le pouvoir phylactique du salicylate, ont donc fixé cette substance.

Nous sommes ici en face d'un troisième mode de fixation par les lipides, les acéto solubles seuls paraissant intéressés. L'action phylactique du salicylate de soude aurait donc pour substratum une modification de certains lipides globulaires.

E/ Ordre de résistance des globules rouges à la quinine suivant l'espèce animale.

Nous avons attaqué le problème de la fixation des substances hémolytiques et phylactiques par la voie indirecte. La composition chimique des hématies varie très largement d'une espèce animale à une autre. En ce qui concerne la cholestérine et les acides gras non volatils, Mayer et Schaeffer ont dressé des tables

de composition suivant les espèces animales (1). C'est à ces valeurs que nous nous rapporterons.

La résistance des globules rouges de différentes espèces vis-à-vis de la quinine est variable. C'est ainsi qu'une solution de bromhydrate de quinine à 0 gr. 50% d'eau physiologique agissant pendant 2 heures, à la température du laboratoire (14°-16°) hémolysera 0 cc. 2 de suspension globulaire (globules lavés) au 1/8 de la façon suivante :

H8 pour le sang de poule,
H8 pour le cobaye,
H2 pour le mouton,
H0 pour le cheval.

Si nous comparons ces chiffres avec la teneur de ces globules en acides gras ou en cholestérine, nous voyons que la résistance croît proportionnellement à la richesse en cholestérine

Espèces :	CHEVAL	MOUTON	POULE	COBAYE
Teneur en cholestérine :	0,553	0,405	0,373	0,336
Degré d'hémolyse :	H0	H2	H8	H8

F/ *Ordre de protection des globules rouges par le formol contre la quinine suivant l'espèce animale.*

Nous avons recherché parallèlement la grandeur de l'action phylactique du formol en fonction de l'espèce, pour voir si, en définitive, cette action ne variait pas suivant un des termes connus de la composition chimique du sang.

Le contact pendant 24 heures de 0 cc. 2 de suspension globulaire au 1/8 avec une solution de formol à 0,65% préserve ces hématies lavées vis-à-vis du sérum quininé à 0,50% de telle sorte, qu'après 8 heures le degré d'hémolyse est de H1 pour la poule, H1 pour le cheval, H6 pour le mouton, H8 pour le cobaye.

Cette protection semble se faire, à peu de chose près, en raison directe de la teneur de ces globules en acides gras :

Espèces :	POULE	CHEVAL	MOUTON	COBAYE
Teneur en cholestérine :	0,373	0,553	0,405	0,336
Teneur en acides gras :	1,247	0,862	0,907	0,822
Degré d'hémolyse :	H2	H1	H6	H8

Si nous observons cette action phylactique du formol en

(1) MAYER et SCHAEFFER. Composition chimique du sang et hémolyse. *C. R. Ac. Sc.*, 1912, CLV, 728.

présence du sérum sanguin (nous savons que dans ce cas la protection est bien meilleure) l'influence de la richesse du sérum en acides gras est bien plus évidente encore :

Espèces :	POULE	CHEVAL	MOUTON	COBAYE
Teneur en cholestérine :	1,700	0,909	0,909	0,883
Teneur en acides gras :	7,469	3,092	2,058	1,679
Degré d'hémolyse :	H0	H0	H4	H8

L'action favorable de l'addition du sérum dans la phylaxie du globule par le formol peut s'interpréter maintenant à l'aide des observations que nous venons de faire. Il est logique de penser que les acides gras du sérum, modifiés par le formol, sont fixés sur le globule, renforçant ainsi la teneur de celui-ci en ces acides, et, par suite, leur résistance à l'hémolyse quininique.

Ces deux séries d'expériences sont les seules que nous puissions produire à l'appui de notre thèse de la fixation du formol sur les constituants lipidiques des tissus ; peut-être seront-elles suffisantes pour entraîner la conviction de nos lecteurs comme elles ont entraîné la nôtre.

Nous pensons avoir apporté des preuves du rôle des substances lipidiques dans les phénomènes de phylaxie et d'hémolyse que nous étudions. Nous considérons en bloc l'ensemble des lipides globulaires et peut-être est-il possible cependant, à la suite des expériences que nous avons relatées dans ce dernier chapitre, de pénétrer plus avant dans l'intimité de ces actions protectrices.

Les phylactiques proprement dits, formol, salicylate, et aussi les phylactiques occasionnels, tels que l'oléate, paraissent se fixer électivement sur les acides gras (ces substances sont en effet solubles dans l'acétone et entraînées par ce liquide). Au contraire, les hémolytiques que nous avons opposés à ces phylactiques (spartéine, quinine) ont une affinité beaucoup plus marquée pour la cholestérine et les lipoïdes voisins (les substances éthéro solubles sont composées en grande partie de cholestérine et de lipides non phosphorés). De telle sorte que — pour les phénomènes que nous avons étudiés — l'opposition des phylactiques aux hémolytiques pourrait se ramener à une opposition des acides gras hydrofuges et de la cholestérine hydrophile. Nous retomberions ainsi dans un cas particulier de variation du facteur d'imbibition : $\frac{\text{cholestérine}}{\text{acides gras fixes}}$ de Mayer et Schaeffer,

dont ces auteurs ont bien démontré le rôle éminent dans la résistance à l'hémolyse.

L'action des substances phylactiques pour le globule rouge est peut-être susceptible d'une autre explication physico-chimique, bien moins éloignée de la précédente qu'elle ne le paraît au premier abord. Les lipides sont des colloïdes pouvant se présenter à l'état de gel ou à l'état de sol, ce dernier état étant le seul propice aux réactions vitales. Cette solubilisation des lipides et des graisses existant normalement dans les tissus vivants, est due à la présence, à leur côté, d'acides gras ou de savons qui sont leurs mobilisateurs indispensables. Dès lors, l'immobilisation de ces savons ou acides gras par une substance telle que le salicylate de soude ou le formol, entraîne la précipitation des micelles ténues de lipides, en granules d'un gel inactif, inapte à la fixation des corps qui ont normalement une grande affinité pour eux (spartéine, quinine). Cette affinité est proportionnelle avec la surface d'adsorption, c'est-à-dire, au degré de fragmentation que leur offre ces lipides. On voit donc que, par cette explication toute physico-chimique, les phénomènes de phylaxie globulaire deviennent assez simples et faciles à concevoir.

Quelle que soit l'explication retenue, variation du facteur d'imbibition ou gélification des lipides cellulaires, nous pensons avoir mis en évidence le support lipidique de cette phylaxie cellulaire.

.....

CONCLUSIONS DE LA II^e PARTIE

Dans le nombre considérable des travaux qui ont été produits sur l'antagonisme ou l'addition des effets de deux ou plusieurs substances hémolysantes, nous ne retiendrons que quelques faits susceptibles d'être interprétés comme des cas de phylaxie globulaire.

Vincent et Dopter (1), puis Parisot et Heully (2), ont observé que le chlorure de calcium augmente la résistance des globules vis-à-vis de la quinine, de l'antipyrine, du chloroforme et de l'éther. La substance protectrice agit, vraisemblablement, par modification des acides gras avec lesquels elle forme des savons

(1) VINCENT et DOPTER. In Parisot et Heully.

(2) J. PARISOT et HEULLY. Chlorure de calcium et résistance globulaire. Recherches sur le pouvoir antihémolytique de Ca Cl₂. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, LXXII, 39.

insolubles. Quant aux substances hémolytiques employées par ces auteurs, elles sont nettement fixées par les lipides, ainsi qu'il ressort des données classiques et de nos recherches en ce qui concerne la quinine.

Soit qu'on se rapporte à des modifications du facteur d'immobilité par action du calcium sur les acides gras, soit que l'on considère les lipoides précipités de leur état de sol par suite de l'immobilisation des acides gras par le calcium, le schéma que nous avons proposé de la phylaxie du globule rouge s'applique ici d'une façon particulièrement heureuse.

En conclusion de cette deuxième partie nous reviendrons sur la réalité d'actions protectrices de certaines substances vis-à-vis d'agents hémolytiques. Ces actions sont très spéciales dans leur nature, il ne s'aurait s'agir de neutralisation de deux substances, car le lavage des globules après le contact avec les protecteurs enlève toute trace de ces agents à l'état libre : ils ne peuvent subsister qu'en combinaisons intimes avec l'hématie. Ces combinaisons sont assez stables pour résister au lavage et à la centrifugation ; elles sont également assez puissantes pour rendre l'hématie réfractaire à l'action hémolytique violente.

Donc, comme pour la phylaxie *in vivo*, il y a modification des tissus eux-mêmes, qui ne peuvent plus être touchés ensuite par la toxine. Les phénomènes que nous observons sur le globule rouge sont donc, dans leur forme, semblables aux phénomènes de phylaxie.

Pour compléter cette identification, nous avons rapporté un assez grand nombre de recherches dont la conclusion nous paraît être : que les substances qui préservent de l'hémolyse, comme celles qui la produisent, se fixent sur les constituants lipidiques du globule. Cette fixation sur un même élément est à rapprocher de l'affinité des phylactiques et des neurotoxiques pour les mêmes éléments lipidiques du tissu nerveux.

Par suite de ces deux ordres de considérations, nous nous croyons en droit de faire rentrer les protections du globule que nous avons observées, dans le cadre général de la phylaxie et d'en faire une modalité que l'on pourrait dénommer « Phylaxie globulaire ou cellulaire ».

Cette étude de la phylaxie globulaire nous a, en outre, entraîné à une conception du mécanisme le plus intime du phénomène que des recherches ultérieures nous paraissent peut-être d'étendre à la phylaxie *in vivo*.

Conclusions

Notre travail comporte donc deux parties bien distinctes dont les conclusions peuvent être :

A) Pour la première partie :

1^o / La toxine tétanique se fixe sur le tissu nerveux, manifestant une affinité particulière pour les lipides.

2^o / La toxine diphtérique se fixe sur les lipides du tissu nerveux.

3^o / L'aldéhyde formique se comporte comme un poison neurotoxique, mais, sa fixation sur le tissu nerveux n'a pas pu être mise en évidence.

4^o / La neurotoxine du venin de vipère se fixe sur les lipides du tissu nerveux.

5^o / Le sulfate de spartéine se fixe sur les lipides du tissu nerveux.

6^o / On peut empêcher *in vitro*, la fixation de toxiques (venin, spartéine, toxine tétanique) sur le tissu nerveux ou ses constituants lipidiques, par action préalable sur ce tissu de substances se montrant phylactiques *in vivo* (spartéine, eau minérale de Choussy, formol).

B) Pour la deuxième partie :

1^o / L'action sur les globules rouges de certaines substances empêche l'action hémolytique d'autres substances.

2^o / Cette action protectrice se manifeste en dehors du mélange des deux substances, par action isolée de chacune d'elles. Dans ces conditions, il ne s'agit pas de neutralisation d'une substance par l'autre, mais de modification par l'une d'elles de la réceptivité du globule rouge.

3^o / Les substances hémolytiques et protectrices (celles-ci sont souvent hémolytiques à des doses plus fortes) se fixent sur les lipides globulaires.

4^o / Ces faits de protection de l'hématie sont identiques, dans leur mode et dans leur mécanisme, aux phénomènes de protec-

tion de l'animal vis-à-vis d'une neurotoxine, désignés sous le nom de Phylaxie.

Les résultats que nous venons de résumer apportent une première base expérimentale à la théorie par laquelle G. Billard explique les phénomènes de Phylaxie.

Les substances phylactiques « teignent » bien le tissu nerveux par l'intermédiaire des lipides. L'affinité des neurotoxines pour ces constituants, (également démontrée) condition de leur pénétration dans l'élément nerveux se trouve ainsi entravée.

Si nous avons pu constater par de nombreuses expériences la réalité de ces fixations sur le tissu nerveux ou ses lipides, nous n'avons pas étudié le mécanisme intime de cette teinture ou fixation ; il faudra la rechercher, sans doute, dans des modifications physico-chimiques des sols lipidiques et du gel protoplasmique (gélification, floculation).

Notre travail n'est donc qu'une étape, dont le but sera atteint s'il paraît démontré que l'explication des phénomènes de phylaxie doit se faire dans le sens prévu par G. Billard.

L'étude de la « Phylaxie globulaire » que nous avons faite et dont les conclusions se gardent de généraliser à toute cellule vivante la notion de phylaxie, nous a seulement servi à apporter une contre-épreuve à la conception que nous soutenons. Nous avons pu saisir sur le globule rouge la reproduction exacte de ce qui se passe *in vivo* pour l'élément nerveux ; teinture préalable et refus consécutif de perméabilité. Par ce moyen commode d'étude nous avons pu déterminer une seconde fois le rôle des lipides dans cette perméabilité et dans cette teinture. C'est dans ce seul but que nous avons décrit la phylaxie globulaire. Les deux parties de ce travail, en apparences divergentes, aboutissent donc au même but qui est un appui expérimental à l'explication des phénomènes de Phylaxie.



SECONDE THESE

1^o *L'immunité chez les végétaux, Pathologie végétale et Pathologie animale.*

2^o *Les formations sédimentaires de la Limagne.*

Les Membres du Jury :

H. CARDOT, F. ROMAN, J. BEAUVÉRIE.

Vu et approuvé,

Pour le Doyen de la Faculté des Sciences, l'Assesseur :

Kœlher.

Vu et permis d'imprimer,

Le Recteur de l'Académie, Président du Conseil de l'Université :

Jh. Gheusi.

Sommaire



AVANT-PROPOS.

INTRODUCTION.

La Phylaxie.....	6
Théorie de la phylaxie.....	14
Définition de la phylaxie et faits qu'elle englobe.....	16

1^{re} PARTIE.

Fixation de substances neurotoxiques sur les éléments nerveux et, plus spécialement, sur les lipides constitutifs du tissu nerveux.....	23
Fixation de la toxine tétanique.....	23
Fixation de la toxine diphtérique.....	27
Fixation du formol.....	29
Fixation du venin de vipère.....	30
Fixation de la spartéine.....	35
Conclusions de la première partie	
Reproduction <i>in vitro</i> de la Phylaxie.....	40

2^e PARTIE.

La phylaxie cellulaire	
Données expérimentales relatives à des actions protectrices vis-à-vis d'agents hémolytiques.....	46
Rôle des lipides dans le mécanisme des actions hémolytiques et phylactiques.....	58
Conclusions de la deuxième partie.....	69
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	71



